

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Tese

Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil

Beatris Gonzalez Cademartori

Pelotas, 2014

Beatris Gonzalez Cademartori

Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (área de conhecimento: Parasitologia)

Orientador: Prof.^a Dr.^a Nara Amélia da Rosa Farias

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Andréa da Silva Ramos Rocha

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C122c Cademartori, Beatris Gonzalez
 Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil / Beatris Gonzalez Cademartori. – 98f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Nara Amélia da Rosa Farias; co-orientador Andréa da Silva Ramos Rocha.

1.Parasitologia. 2.*Toxoplasma gondii*. 3.Isolamento.
4.Suínos. 5.Genotipagem. I.Farias, Nara Amélia da Rosa.
II.Rocha, Andréa da Silva Ramos. III.Título.

CDD: 636.4

Beatris Gonzalez Cademartori

Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil

Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (área de conhecimento: Parasitologia), Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 22 de maio de 2014

Banca examinadora:

.....
Prof.^a Dr.^a Nara Amélia da Rosa Farias (Orientador)

.....
Prof.^a Dr.^a Solange Maria Gennari (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP)

.....
Prof. Dr. Leandro Quintana Nizolli (Faculdade de Medicina Veterinária/UFPel)

.....
Prof.^a Dr.^a Gertrud Müller Antunes (Instituto de Biologia/UFPel)

.....
Dr. Jerônimo Lopes Ruas (Laboratório Regional de Diagnóstico/ Faculdade de Medicina Veterinária/UFPel)

Dedicatória

A Deus,

Por sempre ser a minha luz, guiar meus caminhos
e por ter consentido a oportunidade de realizar um
sonho.

À minha família,

João Francisco, Mariana e Pedro Henrique
pelo incentivo, amor, amizade e incansável
compreensão durante todos esses anos de estudo.

Amo vocês!

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Nara Amélia da Rosa Farias, por todo aprendizado, pelo exemplo de profissional, pela confiança, pela amizade e por ter acreditado no meu potencial. Este sonho só foi concretizado pelo seu constante incentivo. És hoje, não apenas uma orientadora, mas uma pessoa especial e parte da minha história.

À Prof.^a Dr.^a Andréa da Silva Ramos Rocha, coorientadora, pela amizade, pelo companheirismo, pela paciência nos ensinamentos das técnicas de biologia molecular e pelo desafio na realização deste trabalho. Divido contigo este momento de vitória. Serei eternamente grata.

À Prof.^a Dr.^a Solange Maria Gennari e toda a sua equipe da Universidade de São Paulo pela valiosa parceria, oportunidade de treinamento e principalmente, pela abertura das portas para que pudéssemos realizar este trabalho.

À Dr.^a Hilda Pena da Universidade de São Paulo pela hospitalidade, pelos ensinamentos transmitidos durante minha estadia em São Paulo e pelas análises de genotipagem.

Ao Prof. Dr. Fábio Leivas Leite pela disponibilização do seu laboratório no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas para a realização de uma etapa deste trabalho.

Ao Dr. Jerônimo Ruas pelo incentivo, amizade e agradável convivência.

Aos funcionários do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas pela amizade e colaboração durante a realização do experimento.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Parasitologia pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus colegas de laboratório, em especial a Laura Maria Jorge Farias dos Santos, Plínio Oliveira, Pedro Quevedo, Fernando Oliveira, Tatiana Ramos da Silva e Bárbara Peter pela valiosa ajuda durante a fase experimental deste trabalho e agradável convivência.

À empresa WAMA Diagnóstica pela doação das lâminas de imunofluorescência indireta.

A todos os funcionários e colegas que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

CADEMARTORI, Beatris Gonzalez. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2014. 97f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós- Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

O protozoário *Toxoplasma gondii* pode infectar ampla gama de espécies animais, inclusive o homem. Entre os animais domésticos, os suínos têm grande importância, devido ao risco de infecção humana pelo consumo de carnes cruas, mal cozidas e embutidos frescos. O objetivo do estudo foi o isolamento, caracterização biológica e genotípica de *T. gondii* de suínos naturalmente infectados, de criação artesanal, destinados ao consumo humano. Amostras de soros de suínos (100) de 58 propriedades rurais, de diferentes municípios do sul do Rio Grande do Sul foram testadas, através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI ≥ 64). Dos animais amostrados, 36,0% foram soropositivos com títulos de anticorpos que variaram de 64 a 2048. Para o isolamento do parasito, bioensaios em camundongos foram realizados, utilizando-se um pool de tecidos de suínos soropositivos (coração e cérebro). Dos 36 bioensaios, 17 isolados (47,2%) foram obtidos. Destes, 41,2% (7/17) mostraram-se altamente virulentos para os camundongos inoculados, causando 100% de mortalidade. Taquizoítos foram encontrados no exsudato peritoneal, fígado e pulmão. Os demais isolados (10/17) não causaram sinais clínicos, mas foram detectados anticorpos, com títulos de 16 a 512 (RIFI ≥ 16), e cistos do parasito nos cérebros e/ou fígados dos camundongos infectados. Para a caracterização genotípica de todos os isolados (17) utilizou-se a técnica de PCR-RFLP no locus 5'3'SAG2, que identifica os genótipos I, II e III. Genótipos dos Tipos I (29,4% - 5/17) e III (70,6% - 12/17) foram identificados e não houve a detecção do Tipo II. Entre os isolados caracterizados como Tipo I, quatro (80,0%) mataram os camundongos e um (20,0%) não matou nenhum animal. Apenas três isolados do Tipo III (25,0%) foram virulentos, causando a morte dos animais, o que não ocorreu com os outros, nove (75,0%). Dos 17 isolados, até o momento, cinco foram genotipados com mais marcadores, além do 5'3'SAG2 (SAG1, alt. SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3). Foram identificados cinco diferentes genótipos, sendo três já descritos no Brasil (Tipos III, BrII e BrIV) e dois novos genótipos. Os novos genótipos, o BrII e o BrIV foram altamente virulentos, capazes de matar 100% dos camundongos infectados. O isolado Tipo III foi avirulento e cistogênico. Utilizando-se o marcador CS3, verificou-se que os isolados que apresentaram alelos I e u-1 foram virulentos, enquanto que aqueles com o III foram apenas cistogênicos. A caracterização genotípica por PCR-RFLP com mais marcadores é mais acurada, pois possibilita a identificação de genótipos atípicos. Este estudo revela que os suínos criados artesanalmente na região podem servir de fonte de infecção humana pelo parasito, estando infectados por uma população de *T. gondii* diversificada quanto a características de virulência e genotípicas.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; isolamento; suínos; genotipagem

Abstract

CADEMARTORI, Beatris Gonzalez. **Biological and genotypic characterization of isolates of *Toxoplasma gondii* from naturally infected pigs from Rio Grande do Sul, Brazil.** 2014. 97f. Thesis (Doctorate Degree in Parasitology) - Graduation Program in Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2014.

The protozoan *Toxoplasma gondii* can infect a wide range of animal species, including man. Among domestic animals, pigs have greater importance due to the risk of human infection by ingestion of raw or undercooked meat and handmade sausages. The aim of the study was the isolation and genotypic characterization of *T. gondii* from small farms pigs naturally infected, intended for human consumption. Serum samples from pigs (100) of 58 farms in different of municipalities southern Rio Grande do Sul were analyzed by indirect fluorescence antibody test (IFAT ≥ 64). 36.0% of the animals sampled were seropositive with antibody titers from 64 to 2048. To isolate the parasite, bioassays in mice were performed using a pool of seropositive pig tissues (heart and brain). From the 36 bioassays, 17 isolated (47.2%) were obtained. 41.2% of these (7/17) proved to be highly virulent to the inoculated mice, causing 100% mortality. Tachyzoites were found in peritoneal exudates, livers and lungs. The remaining isolates (10/17) did not cause clinical signs, but antibodies were detected with titers from 16 to 512 (IFAT ≥ 16), and cysts of the parasite in the brains and/or livers of the infected mice. For the genotypic characterization of all isolates (17) the PCR-RFLP technique was used in the locus 5'3'SAG2 that identifies genotypes I, II and III. Genotypes Type I (29.4% - 5/17) and III (70.6% - 12/17) were identified and there was no detection of Type II. Among the isolates characterized as Type I, four (80.0%) killed the mice and (20.0%) did not kill any animal. Only three isolates of Type III (25.0%) were virulent, causing the death of animals, which did not occur with the remaining nine (75.0%). Among 17 isolates, five were genotyped with more markers up to this moment, in addition 5'3'SAG2 (SAG1, alt. SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3). Five different genotypes were identified, three of them having already been described in Brazil (Types III, BrII and BrIV) and two being newly identified genotypes. The new genotypes, BrII and BrIV were highly virulent, able to kill 100% of the infected mice. The isolate Type III was avirulent and cystogenic. Using the marker CS3, it was found that the isolates which presented alleles I and u-1 were virulent, while those with only III were only cystogenic. Genotypic characterization by PCR-RFLP with more markers is more accurate, since it allows the identification of atypical genotypes. This study reveals that small farms pigs in the region might serve as a source of human infection by the parasite, once they are infected by a population of *T. gondii* which is diversified regarding virulence characteristics and genotype.

Key words: *Toxoplasma gondii*; isolation; pigs; genotyping

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> (modificado por Dubey, 1983).....	23
----------	---	----

Capítulo 1

Figura 1	Animais bioensaiados apresentando sinais clínicos de toxoplasmose aguda.....	41
Figura 2	Órgãos de camundongo bioensaiado apresentando lesões inflamatórias no fígado (A) e alteração no tamanho do baço (esplenomegalia) (B) na toxoplasmose aguda.....	42
Figura 3	Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> em exsudato peritoneal (A) e pulmão (B) de camundongo infectado, corado com Giemsa (1000x) e (400x).....	42
Figura 4	Cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em fígado de camundongo, corados por Giemsa (1000x) (A) e Hematoxilina-eosina (400x) (B).....	43

Capítulo 2

Figura 1	PCR-RFLP do <i>locus</i> 5'3'SAG2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de <i>T. gondii</i> de suínos. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease <i>Mbol</i> . (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease <i>HhaI</i> . M (marcador de peso molecular), isolados (TgPgBrRs87, 88, 89, 91, 97, 98 e 100), cepas de referência RH (genótipo I) , PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).....	54
----------	---	----

Figura 2 PCR-RFLP do *locus* 5'3'SAG2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Mbol*. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*. M (marcador de peso molecular), isolados (TgPgBrRs19, 51, 46, 54, 90, 95, 99, 91, 92 e 94), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo)..... 55

Lista de Tabelas

Revisão Bibliográfica

Tabela 1	Soroprevalência de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no mundo.....	27
Tabela 2	Soroprevalência de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no Brasil.....	28
Tabela 3	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de suínos naturalmente infectados.....	29

Capítulo 1

Tabela 1	Anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> (RIFI ≥ 64) em suínos naturalmente infectados de diferentes municípios do Rio Grande do Sul.....	39
Tabela 2	Relação entre o título de anticorpos (RIFI ≥ 64) em suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul e o isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i>	39
Tabela 3	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul.....	40

Capítulo 2

Tabela 1	Caracterização genética dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul através da PCR-RFLP, no locus 5'3' SAG2 e fenótipo de virulência nos camundongos infectados.....	53
----------	--	----

Tabela 2	Caracterização genética dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul analisados pela PCR-RFLP e identidade com outros isolados brasileiros.....	56
Tabela 3	Taxa de mortalidade dos camundongos infectados com isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de suínos do Rio Grande do Sul, caracterizados pelo marcador CS3.....	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA	Albumina Sérica Bovina
BA	Bahia
dATP	2'- deoxiadenosina 5'- trifosfato
dCTP	2'- deoxicitosina 5'- trifosfato
dGTP	2'- deoxiguanosina 5'- trifosfato
DNA	Desoxiribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
dTTP	2'- deoxitimina 5'- trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Elisa	Enzima imunoensaio
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
g	grama(s)
h	hora
HAI	Hemaglutinação Indireta
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test
IgG	Imunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
MAT	Teste de Aglutinação Modificado
µg	micrograma(s)
mg	miligrama(s)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
µL	microlitro(s)
µM	Micromolar
min	minuto (s)

mL	mililitro(s)
mM	milimolar
MG	Minas Gerais
N	Normal
Nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
PB	Paraíba
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
p.i	pós- inoculação
PR	Paraná
RFLP	Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
RJ	Rio de Janeiro
S	Sul
SDS	dodecilsulfato de sódio
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SP	São Paulo
<i>Taq</i>	<i>Thermophillus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris borato-EDTA
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tris	Hidroximetilaminometano
U	unidade internacional
USP	Universidade de São Paulo
v/v	volume/volume
W	Oeste

Sumário

1 Introdução Geral.....	16
2 Objetivos	18
3 Revisão de Literatura	19
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	19
3.1.1 Histórico	19
3.1.2 Taxonomia	21
3.1.3 Ciclo Biológico e Morfologia	21
3.1.4 Transmissão e epidemiologia.....	24
3.1.5 Importância do suíno na toxoplasmose.....	26
3.1.6 Isolamento de cepas de <i>T. gondii</i> de suínos	28
3.1.7 Caracterização genotípica de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
4 Capítulo 1 - Isolamento e patogenicidade de <i>Toxoplasma gondii</i> de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul.....	35
4.1 Introdução	35
4.2 Materiais e métodos	36
4.2.1 Amostras de suínos naturalmente infectados	36
4.2.2 Análise sorológica	37
4.2.3 Bioensaio em camundongos	37
4.2.4 Análise estatística	38
4.2.5 Aspectos Éticos.....	38
4.3 Resultados	38
4.4 Discussão.....	44
4.5 Conclusão	46
5 Capítulo 2 - Caracterização genotípica de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul	47
5.1 Introdução	47

5.2 Materiais e métodos	49
5.2.1 Isolados de <i>T. gondii</i>	49
5.2.2 Extração do DNA	49
5.2.3 PCR e <i>nested</i> -PCR	50
5.2.4 PCR-RFLP	51
5.2.5 Análise dos resultados da genotipagem	52
5.2.6 Relação entre genótipo e virulência em camundongos.....	52
5.2.7 Aspectos Éticos.....	52
5.3 Resultados	52
5.4 Discussão	59
5.5 Conclusão	63
6 Conclusões gerais	64
Referências	65
Apêndices.....	82
Anexos	94

1 Introdução Geral

A toxoplasmose é uma zoonose parasitária de distribuição mundial, causada pelo *Toxoplasma gondii*. A transmissão ocorre principalmente através de alimentos contaminados pelo protozoário, seja através do consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos, pela ingestão de água, verduras e legumes contaminados por oocistos. Outras formas de transmissão são a transplacentária, transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos.

A maioria das infecções em humanos e animais é assintomática, mas virulência diferenciada tem sido registrada, principalmente em indivíduos imunossuprimidos e em recém-nascidos de mães primo-infectadas.

Entre os animais de produção de carne, os suínos representam uma importante fonte de infecção para *T. gondii* em humanos, através do consumo de sua carne mal cozida e/ou embutidos artesanais (DUBEY, 2009). Segundo Tenter (2009), estes produtos são responsáveis pela maioria dos casos de toxoplasmose humana no mundo. No Brasil, poucos são os trabalhos de isolamento e caracterização biológica e genética de isolados de *T.gondii* proveniente destes animais. No Paraná, Dias et al. (2005) detectaram a presença de cistos de *T. gondii* em 13 das 149 (8,7%) amostras de linguiças de origem suína tipo frescal, verificada por meio do bioensaio em camundongos.

As cepas de *T.gondii* foram classificadas em três linhagens, designadas Tipo I, II e III, que ocorrem tanto em humanos como em animais, com diferentes prevalências de acordo com a região geográfica analisada. Cepas do Tipo I são classificadas como altamente virulentas, ao passo que as dos Tipos II e III são consideradas de menor virulência para os diferentes hospedeiros (HOWE; SIBLEY, 1995). Entretanto, pesquisas nos últimos anos têm apontado um alto percentual de

genótipos atípicos ou recombinantes, o que sugere variações na epidemiologia de *T. gondii* dependendo da região estudada (DUBEY et al., 2010; MERCIER et al., 2010; BEZERRA et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2012; DUBEY et al., 2013).

Estudos relataram que os isolados do Brasil são biológica e geneticamente diferentes dos isolados dos EUA e Europa (BELFORT-NETO et al., 2007; DUBEY et al., 2007; DUBEY et al., 2008a; DUBEY et al., 2010; BEZERRA et al., 2012; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013). Linhagens clonais parecem predominar também na África, com prevalência maior dos Tipos II e III (VELMURUGAN et al., 2009). Genótipos clonais Tipo II foram pouco identificados no Brasil; Dubey et al. (2010) encontraram este tipo em amostra de galinhas oriundas da ilha de Fernando de Noronha. Entretanto no Brasil, a grande maioria dos estudos constatou alta variação genética, com presença de muitos alelos atípicos (DUBEY et al., 2007; DUBEY et al., 2008a; PENA et al., 2008).

Pena et al. (2008) relataram que os estudos de genotipagem embasados em 12 *loci* gênicos (SAG1, 5'3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3) possibilitam a confirmação da existência de uma população clonal de *T. gondii* muito variada.

Pesquisas preliminares para detecção de anticorpos para *T. gondii* em suínos, galináceos, ovinos e bovinos realizados na região de Pelotas, RS, mostraram soropositividade de 20,2% a 38% nesses animais, confirmando a importância epidemiológica do parasito (PEREIRA, 2005; DUBEY et al., 2007; PAPPEN, 2008; SANTOS et al., 2013). Adicionalmente, Dubey et al. (2007) isolaram o protozoário de corações e cérebros de 19 galinhas caipiras dessa região e na análise do DNA desses isolados com 11 marcadores genéticos (SAG1, 5'3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico) foi possível detectar a presença de genótipos do Tipo I e III, além de genótipos recombinantes, ou seja, diferentes dos alelos I, II e III. Este foi o primeiro e único registro, até o momento, de caracterização molecular de cepas de *T. gondii* na região.

Tendo em vista a frequência sorológica para *T. gondii* encontrada e a inexistência de trabalhos de genotipagem de isolados em tecidos de suínos, justifica-se uma pesquisa que caracterize biológica e geneticamente os isolados de *T. gondii* desses animais na região.

2 Objetivos

Geral

- Caracterizar biológica e geneticamente isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul.

Específicos

- Isolar e caracterizar biologicamente *T. gondii* de tecidos de suínos naturalmente infectados, através do bioensaio em camundongos;
- Caracterizar genotipicamente os isolados de *T.gondii* obtidos de suínos através da técnica PCR-RFLP, utilizando marcadores genéticos específicos;
- Comparar os perfis genotípicos de *T. gondii* encontrados nos isolados, com os já descritos no Brasil.

3 Revisão de Literatura

3.1 *Toxoplasma gondii*

3.1.1 Histórico

O protozoário foi descrito pela primeira vez em coelhos de laboratório por Splendore (1908) em São Paulo e, simultaneamente por Nicolle & Manceaux (1908) na Tunísia, norte da África, no cérebro de um roedor selvagem, *Ctenodactylus gundi*.

Em 1923, Jankü, em Praga, realizou a primeira descrição de toxoplasmose congênita no ser humano, em uma criança falecida com 11 meses de idade apresentando hidrocefalia e cegueira. À necropsia, cortes do globo ocular direito evidenciaram a presença de parasitos semelhantes a *T. gondii*.

Entre os anos de 1937 e 1939 foi realizado o reconhecimento de *T. gondii* como agente causador de encefalomielite em neonatos humanos e, nesse último ano foi determinada uma tríade clássica de sintomas da toxoplasmose congênita em humanos: retinocoroidite, hidrocefalia e encefalite seguida de calcificação cerebral (WOLF; COWEN, 1937; WOLF et al., 1940).

A descoberta de *T. gondii* como causa de infecção adquirida em adultos é creditada a Pinkerton & Weinman, que em 1940, no Peru, descreveram um caso de doença fatal generalizada em um jovem.

Sabin & Feldman (1948) criaram o teste do corante de Sabin-Feldman, permitindo que vários pesquisadores estudassem os aspectos clínicos e epidemiológicos da toxoplasmose, demonstrando ser uma infecção de alta prevalência no mundo e assintomática na maioria dos indivíduos.

Em 1952, nos Estados Unidos, Farrel et al. reportaram, pela primeira vez, a infecção em suínos; e, no Brasil, a primeira citação foi feita por Silva (1959), no estado de Minas Gerais.

Os primeiros estudos sobre a possibilidade de transmissão horizontal através de cistos teciduais de carne crua de suínos foram realizados entre os anos de 1954 a 1956 (WEINMAN; CHANDLER, 1954; WEINMAN; CHANDLER, 1956).

Entretanto, essa hipótese só foi confirmada por Jacobs et al. (1960), que esclareceram o significado da forma cística do protozoário e a importância do consumo da carne mal cozida, como fonte de infecção para os humanos.

Em 1959 foi detectada a presença de anticorpos para *T. gondii* em pessoas vegetarianas (RAWAL, 1959). Porém, somente em 1965 foi levantada a hipótese que uma fase infectante seria liberada no meio ambiente através das fezes dos gatos (HUTCHISON, 1965).

Amaral e Macruz (1969) demonstraram a presença do parasito em diafragmas de 25 suínos aparentemente normais.

Foi somente em 1969, 60 anos após a descoberta do parasito, que o protozoário foi reconhecido como coccídio e teve seu ciclo biológico descrito, tendo como hospedeiros definitivos os felídeos em geral, e não apenas o gato doméstico, e como hospedeiros intermediários, os mamíferos, aves e roedores (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970).

A partir de 1980, com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), ocorreram os primeiros registros de toxoplasmose no sistema nervoso central de indivíduos doentes, sendo reconhecido como patógeno oportunista (LUFT et al., 1983; LUFT et al., 1984).

Nas últimas décadas, inúmeras conquistas foram alcançadas tanto no desenvolvimento de métodos sorológicos, como na biologia celular e molecular, que tem permitido um melhor diagnóstico do parasito em humanos e animais.

3.1.2 Taxonomia

Segundo Levine (1980), *Toxoplasma gondii* é classificado como:

Reino Protista

Subreino Protozoa

Filo Apicomplexa

Classe Sporozoea

Subclasse Coccidia

Ordem Eucoccidiida

Subordem Eimeriina

Família Sarcocystidae

Subfamília Toxoplasmatinae

Gênero *Toxoplasma*

Espécie *Toxoplasma gondii*

3.1.3 Ciclo Biológico e Morfologia

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxeno facultativo, pois ocorre em duas fases distintas, sexuada ou enteroepitelial e assexuada ou extra-epitelial. A fase sexuada ocorre no hospedeiro definitivo, da família Felidae e, a fase assexuada, nos hospedeiros intermediários, mamíferos, aves (DUBEY, 2010; ESMERINI et al., 2010).

A fase sexuada, chamada gametogonia, ocorre no epitélio intestinal dos felídeos domésticos ou selvagens, quando os mesmos ingerem oocistos ou cistos teciduais contendo bradizoítos. O processo de gametogamia ocorre após a esquizogonia ou merogonia, reprodução assexuada que ocorre nos hospedeiros definitivos e que origina os esquizontes ou merozoítos de primeira e segunda geração, iniciando a partir daí, o ciclo gametogênico. Milhões de oocistos imaturos podem ser liberados após a gametogonia e a liberação pode durar semanas. Os felídeos jovens são os mais suscetíveis à infecção e também são os principais eliminadores de oocistos no ambiente (ELMORE et al., 2010). Após serem eliminados com as fezes no meio ambiente, os oocistos tornam-se esporulados em

um a cinco dias e podem permanecer viáveis por até 24 meses, desde que não expostos à luz solar direta e umidade relativa do ar muito baixa (DUBEY, 2008).

A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários, é chamada endodiogenia e, resulta na produção de cistos teciduais (bradizoítos). Esses hospedeiros se infectam a partir de oocistos esporulados ou por carnivorismo, ingerindo os cistos com bradizoítos (ELMORE et al., 2010). A fase de parasitemia pode durar de oito a dez dias. Os esporozoítos ou bradizoítos livres invadem a mucosa intestinal, se transformam em taquizoítos e passam para a circulação geral. Segue-se uma fase mesenquimatosa, e posterior fase parenquimatosa que correspondem, respectivamente, às fases de multiplicação por endodiogenia e multiplicação lenta dos bradizoítos no interior dos cistos (DUBEY, 2008). A transformação de taquizoíto em bradizoíto ocorre no momento em que o hospedeiro começa a desenvolver resposta imune, que atua sobre a multiplicação dos taquizoítos, os quais passam a dividir-se mais lentamente, sendo então denominados bradizoítos. Esses se encontram no interior dos cistos, protegidos contra a ação do sistema imune e de drogas. As células hospedeiras podem tolerar uma carga muito maior de bradizoítos do que de taquizoítos. Dessa forma, observa-se que a imunidade não determina o fim da infecção, mas impede a multiplicação de taquizoítos e a destruição da célula hospedeira (DUBEY, 2010). Na figura 1, encontra-se o ciclo biológico de *T. gondii*.

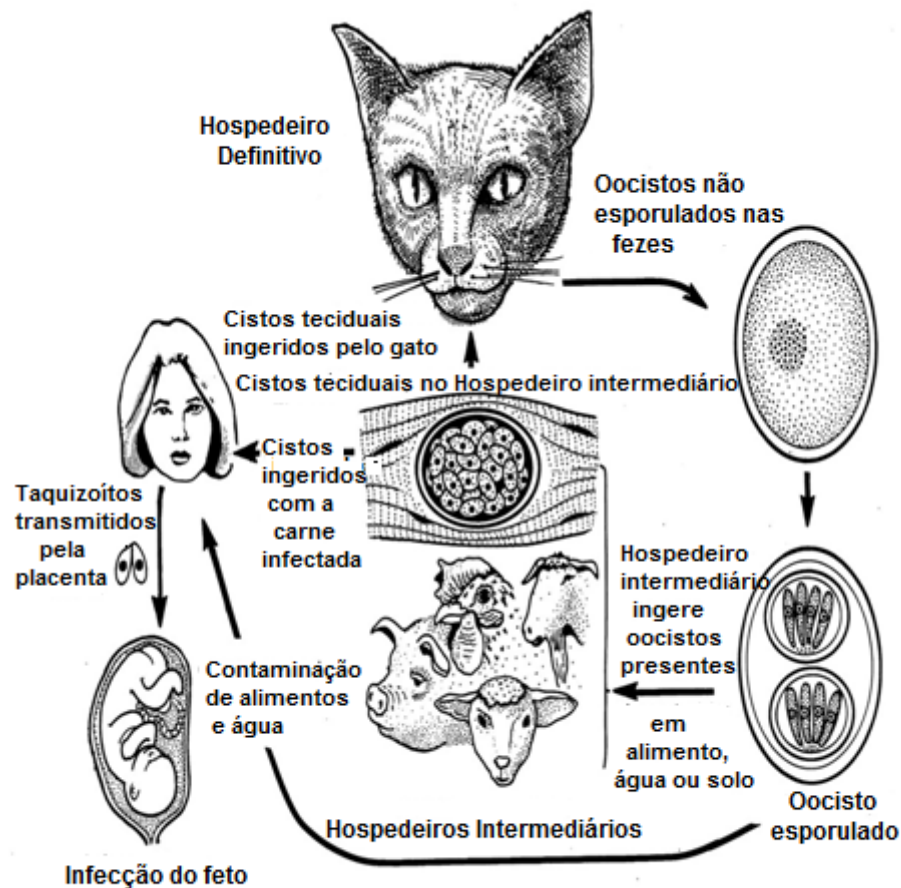


Figura 1 - Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (modificado por Dubey, 1983).

Esse parasito é encontrado sob três formas evolutivas: taquizoítos, bradizoítos contidos em cistos teciduais e esporozoítos, em oocistos esporulados. As três formas são infectantes tanto para os hospedeiros intermediários como para os definitivos (DUBEY, 2008).

Taquizoítos são formas intracelulares e livres, apresentam-se sob a forma de um arco com uma extremidade afilada e outra arredondada. Medem, aproximadamente, 4 - 9 μm de comprimento por 2 - 4 μm de diâmetro (DUBEY, 2010). São encontrados na fase aguda da infecção, no interior das células infectadas presentes no sangue, linfa, secreções e exsudatos de animais e do homem (DUBEY, 2008). Constituem a forma menos resistente do parasito, não sobrevivem ao congelamento, dessecação e ao suco gástrico (DUBEY, 2010).

Bradizoítos são formas assexuadas do parasito, morfologicamente semelhantes aos taquizoítos. Estão presentes no interior dos cistos teciduais,

durante a fase crônica ou latente da infecção. Mesmo com a morte do animal, os cistos se mantêm viáveis e são capazes de transmitir a infecção (DUBEY, 2005). Os cistos cerebrais são de forma esférica e raramente alcançam o diâmetro de 70 μm , enquanto que os cistos intramusculares têm um formato mais alongado e podem chegar a 100 μm . Essa forma do protozoário é a principal responsável pela transmissão da infecção, através do consumo de carne crua ou mal cozida (DUBEY, 2010).

Dentro do cisto, os bradizoítos não são atingidos pelo sistema imune do hospedeiro. Esses cistos se formam com o início da resposta imune do hospedeiro, possuindo alta afinidade pelo tecido muscular, especialmente músculo cardíaco, nervoso e retina. Também podem ser encontrados em outros órgãos e tecidos como fígado, rins e pulmões entre outros (DUBEY, 2008).

Oocistos são esféricos e medem, aproximadamente, 10 - 12 μm de diâmetro. É a forma infectante mais resistente, produzida no intestino dos felídeos não imunes. São excretados com as fezes. No meio externo, após sofrerem o processo de esporulação, contém dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. São resistentes aos desinfetantes, congelamento e mortos através do aquecimento a 70°C por dez minutos. Representam importante forma de disseminação do parasito no meio ambiente, podendo infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários através do consumo de água ou alimentos contaminados (JONES; DUBEY, 2010).

3.1.4 Transmissão e epidemiologia

As três principais formas de transmissão do parasito são a ingestão de oocistos esporulados, eliminados pelos felídeos, que contaminam o solo, os alimentos e a água; o consumo de carnes e/ou vísceras cruas ou mal cozidas contendo cistos teciduais e a transplacentária. Outras, menos frequentes, podem ocorrer por transplante de órgãos e transfusões sanguíneas (ELMORE et al., 2010).

Os felídeos são considerados os principais mantenedores do parasito no meio ambiente. Em condições naturais, eliminam os oocistos nas fezes geralmente após a primo-infecção, que pode ser nos primeiros meses ou ao longo da vida. Esses oocistos contaminam o meio ambiente, água e alimentos, o que possibilita a sua ingestão pelo homem, animais domésticos e silvestres (DUBEY, 2010).

As formas de infecção podem variar dependendo dos fatores sociais e higiênicos, da umidade ambiental, da ocupação profissional, dos hábitos e costumes dos habitantes de determinada região, do grau e da frequência de exposição ao agente (ELMORE et al., 2010).

Sobral et al. (2005) pesquisaram três tribos indígenas (Enawenê-Nawê em Mato Grosso, Waiãpi no Amapá e Tiriýó na fronteira com o Suriname), sendo a maior prevalência encontrada na primeira (80,4%) onde, apesar de os habitantes não comerem carne, costumavam se alimentar de cogumelos da floresta, com grande quantidade de matéria orgânica no solo. Além disso, essa tribo é visitada por felídeos silvestres à procura de água e alimentos, que podem contaminar o solo com oocistos eliminados nas fezes.

A transmissão congênita por *T. gondii* pode ocorrer quando a infecção aguda ocorre durante a gestação, com consequências mais sérias aos fetos no primeiro terço ou metade da gestação. No entanto, quanto mais adiantada a gravidez, maior a probabilidade de infecção fetal, porém com menores riscos de fetopatias graves. *T. gondii* multiplica-se na placenta e, então, se difunde para os tecidos fetais (DUBEY, 2010).

Assi et al. (2007) relataram caso de transmissão de toxoplasmose via transplante de fígado; o paciente desenvolveu pneumonia após 32 dias do transplante; a transmissão da doença pela doação do órgão foi confirmada por meio de testes sorológicos e moleculares.

Devido à grande importância como um agente zoonótico, *T. gondii* é um dos parasitos mais estudados em todo o mundo (EDELHOFER; PROSSINGER, 2010).

No Brasil, a soroprevalência de *T. gondii* em humanos varia de 33,8% a 84,0% (SOUZA et al., 2010; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003) e, em animais, depende da espécie estudada: suínos de criação artesanal (30,76% - 65,8,0%) (BEZERRA et al., 2009; BONNA et al., 2006), ovinos (20,7% - 38,2%) (SOARES et al., 2009; UENO et al., 2009), caprinos (17,1% - 45,7%) (de LIMA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2009), gatos (14,3% - 72,0%) (ROSA et al., 2010; COSTA et al., 2012), galinhas caipiras (36,1% - 84,0%) (de OLIVEIRA et al., 2009; DUBEY et al., 2010) e bovinos (3,0% - 71,0%) (COSTA et al., 2012; SANTOS et al., 2009).

Na região de Pelotas, estudos de ocorrência de anticorpos para *T. gondii* têm sido realizados em humanos e em animais. Nos humanos, verificou-se uma soropositividade para *T. gondii* de 54,8% em gestantes (CADEMARTORI et al.,

2008), 57,5% em doadores de sangue (LOGES et al., 2012) e 80,0% em indivíduos HIV positivos (XAVIER et al., 2013). Em animais, o percentual encontrado foi de 33,9% em suínos de criação artesanal (PEREIRA, 2005), 38,0% em galinhas caipiras (DUBEY et al., 2007), 20,2% em ovinos (PAPPEN, 2008), 18,1% em cães (SANTOS et al., 2012), 27,2% em bubalinos e 17,4% em bovinos (SANTOS et al., 2013). Esses pesquisadores constataram grande desinformação sobre a zoonose, em estudos realizados na população humana da região.

3.1.5 Importância do suíno na toxoplasmose

A ingestão de carne e derivados crus ou mal cozidos, é provavelmente a via de transmissão mais frequente para a toxoplasmose humana. Entre os animais de produção, destaca-se a carne de suínos, ovinos e caprinos (DUBEY, 2008).

No Brasil, em algumas regiões, os embutidos artesanais preparados com carne suína, representam uma fonte de infecção importante, não só para os indivíduos que os ingerem, mas também para aqueles que estão envolvidos com a sua preparação (SPALDING et al., 2005). Essa afirmação foi confirmada por Dias et al. (2005) que demonstraram a presença de cistos de *T. gondii* em amostras de linguiças suínas tipo frescal, por meio do bioensaio em camundongos. Em outro estudo, foram avaliados cérebros de suínos comercializados para consumo humano no município de Campos dos Goytacazes - RJ, onde verificaram um percentual de 50% de positividade para a presença do parasito (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006).

Em suínos, *T. gondii* pode causar pneumonia, encefalite, abortos, mortalidade em jovens e problemas reprodutivos (DUBEY, 2009). Na Tailândia, uma fêmea suína soropositiva para *T. gondii* gerou três leitões natimortos e seis vivos, que apresentaram quadros de dispnéia e diarreia sanguinolenta. Foi realizada a necropsia em um leitão que nasceu vivo e em um natimorto. Toxoplasmose foi diagnosticada em ambos os leitões através da presença de taquizoítos em *imprints* de pulmão (THIPTARA et al., 2006). Recentemente, Kim et al. (2009) relataram um surto de toxoplasmose em suínos na Coreia. Os animais apresentaram febre, anorexia, sinais neurológicos e abortos. O parasito foi encontrado em tecidos de suínos adultos e em fetos abortados.

Muitas pesquisas baseadas na presença de anticorpos para *T. gondii* em suínos têm revelado distribuição mundial do parasito nessa espécie animal. Na

última década, houve diminuição da prevalência de infecção por *T. gondii* em suínos criados em granjas tecnificadas. Isto ocorreu devido a mudanças no manejo, à adoção de medidas adequadas de higiene e prevenção. Por outro lado, a produção de animais em criação artesanal (não tecnificada) pode estar associada à infecção por *T. gondii*, pela contaminação do ambiente com oocistos (DUBEY, 2009). Este dado foi confirmado na região de Pelotas (RS), onde a soroprevalência foi de 5,8%, em suínos de criação industrial e de 33,9%, nos de criação artesanal abatidos na região (PEREIRA, 2005).

Na tabela 1, pode-se observar a prevalência de anticorpos para *T. gondii* em suínos de diferentes países. Dentre eles, destaca-se o México com 92,8% de soropositividade em 429 animais estudados. Os pesquisadores relataram que o elevado percentual encontrado pode estar relacionado a fatores de risco pesquisados como: tamanho da propriedade, tipo de alimentação, sistema de criação, armazenamento dos alimentos, presença de roedores e gatos na propriedade (ORTEGA-PACHECO et al., 2013). No Canadá, a prevalência foi de 0,74%, em estudo realizado com 6048 suínos de criações altamente tecnificadas (POLJAK et al., 2008).

Tabela 1 - Soroprevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em suínos no mundo

País	Nº	Positivos %	Técnica	Referências
Alemanha	4999	4,1	ELISA	de Buhr et al. (2008)
Argentina	230	37,8	MAT	Venturini et al. (2004)
Canadá	6048	0,74	ELISA	Poljak et al. (2008)
EUA	6238	2,65	ELISA	Hill et al. (2009)
Itália	3472	10,4	ELISA	Villari et al. (2009)
Holanda	406	10,9	ELISA	Kijlstra et al. (2008)
México	429	92,8	ELISA	Ortega-Pacheco et al. (2013)
Panamá	290	32,1	RIFI	Correa et al. (2008)
Polônia	106	26,4	MAT	Sroka et al. (2008)
Portugal	333	15,6	MAT	de Sousa et al. (2006)
Sérvia	488	9,2	MAT	Klun et al. (2011)
Vietnã	587	27,2	MAT	Huong; Dubey (2007)

ELISA-Enzima imunoensaio; MAT-Teste de Aglutinação Modificado; RIFI- Reação de Imunofluorescência indireta

No Brasil, vários estudos avaliaram a soropositividade para *T. gondii* em suínos (Tabela 2). Os resultados obtidos são expressivos e ressaltam a importância desta espécie animal na dispersão do parasito no país.

Tabela 2 - Soroprevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em suínos no Brasil

Local	Tipo de criação	Nº	Positivos %	Técnica	Referências
Bahia	Granjas	371	14,8	ELISA	Bezerra et al. (2009)
Bahia	Artesanal	94	31,9	ELISA	Bezerra et al. (2009)
Paraíba	NI	130	36,2	RIFI	de Azevedo et al. (2010)
Paraná	Granjas	193	13,4	MAT	Piassa et al. (2010)
Pernambuco	Granjas	305	12,5	RIFI	Fernandes et al. (2012)
Rio de Janeiro	Granjas	38	65,8	RIFI	Bonna et al. (2006)
Rio Grande do Sul	Granjas	195	5,8	RIFI	Pereira (2005)
Rio Grande do Sul	Artesanal	195	33,9	RIFI	Pereira (2005)
Rondônia	Granjas	80	33,5	MAT	Cavalcante et al. (2006)
São Paulo	Granjas	550	20,2	MAT	Oliveira et al. (2007)

RIFI- Reação de Imunofluorescência indireta; ELISA-Enzima imunoensaio, MAT-Teste de Aglutinação Modificado

3.1.6 Isolamento de cepas de *T. gondii* de suínos

O parasito tem sido isolado de diversos tecidos de suínos em todo o mundo, sejam estes oriundos de abatedouros ou de granjas (Tabela 3). Porém, o sucesso do isolamento tem variado muito devido aos procedimentos da prova biológica empregada, a quantidade de tecidos utilizada e a concentração de parasitos em amostras de tecidos. Mas, um fator que tem aumentado a eficiência de isolamento é a avaliação sorológica prévia dos animais (DUBEY et al., 2005). Segundo Dubey (2010), outro fator importante é a quantidade de tecido bioensaiado, pois ao utilizarem gatos como modelo experimental, a taxa de isolamento foi superior à obtida em camundongos, pois a quantidade de tecido utilizado no bioensaio com os felinos é dez vezes maior ($\pm 500g$).

Em Portugal, de Sousa et al. (2006) obtiveram o parasito viável em 15 amostras de cérebro e coração de 37 suínos soropositivos. Em outro trabalho, foram avaliados 2094 lombos de suínos adquiridos em estabelecimentos comerciais ao redor dos EUA. O resultado foi de sete isolamentos, mas provavelmente este resultado teve influência do congelamento prévio, comum a carnes obtidas em supermercados e açougues (DUBEY et al., 2005), que pode ter inviabilizado muitos parasitos.

No Brasil, algumas pesquisas já foram realizadas utilizando tecidos de suínos no isolamento do parasito, através do bioensaio em camundongos. No estudo conduzido por dos Santos et al. (2005) foram analisados 28 corações, cérebros e línguas de suínos e *T. gondii* foi isolado de sete amostras. Frazão-Teixeira et al. (2006) ao avaliarem 12 cérebros provenientes do mercado popular de Campos dos Goytacazes (RJ) obtiveram isolamento em seis amostras.

Em outro estudo, pesquisa realizada no nordeste brasileiro por Bezerra et al. (2012), em língua e cérebro de 20 suínos, isolaram *T. gondii* em 11 amostras.

Tabela 3 - Isolamento de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados

País	Procedência	Nº	Positivos %	Tecidos analisados	Referências
Brasil	Açougue	28	7 (25)	Cérebro Coração Língua	dos Santos et al. (2005)
	Açougue	149	13 (8,7)	Linguiça	Dias et al. (2005)
	Açougue	20	11(55)	Língua Cérebro	Bezerra et al. (2012)
EUA	Açougue	2094	7 (0,3)	Lombo	Dubey et al. (2005)
	Açougue	38	14 (36,8)	Coração	Dubey et al. (2008)
	Açougue	300	29 (9,6)	Coração	Velmurugan et al. (2009)
	Fazenda	33	17(51,5)	Coração	Dubey et al. (2012)
Portugal	Açougue	37	15 (40,5)	Coração Cérebro	de Sousa et al. (2006)
Sérvia	Fazenda	22	12 (54,5)	Coração	Klun et al. (2011)

3.1.7 Caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii*

A avaliação da variabilidade genética das cepas de *T. gondii* é importante para estudos da biologia do parasito e da epidemiologia da enfermidade, e sua possível utilização no diagnóstico, seja para avaliar o risco de desenvolvimento de casos graves em dada população, seja para estimar o prognóstico em casos individuais (DEMAR et al., 2008).

Em animais, grande parte dos estudos de genotipagem, concentra-se na análise de cepas obtidas de infecções crônicas, derivadas do isolamento em camundongos.

As amostras de *T. gondii* possuem similaridade antigênica, morfológica e na capacidade de infectar vários hospedeiros (DUBEY, 2010). Estudos iniciados em 1988 com o emprego de técnicas moleculares e com a utilização de isoenzimas demonstraram que a estrutura populacional do parasito era do tipo clonal (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Em 1995, um sistema de tipificação baseado na diferenciação *multilocus* por PCR-RFLP permitiu subdividir a população deste parasito em três linhagens clonais denominadas: Tipos I, II e III (HOWE; SIBLEY, 1995). Após a definição das linhagens I, II e III, as tipificações de *T. gondii* passaram a ser realizadas com apenas um *locus*, SAG2, localizado no cromossomo VIII e que codifica o antígeno de superfície *p22* do parasito (HOWE et al., 1997; FUENTES et al., 2001; DUBEY et al., 2002a).

Estudos posteriores com marcadores microssatélites e com PCR-RFLP, aplicados a um maior número de amostras, revelaram que as amostras do protozoário oriundas de outras regiões do mundo, além de Europa e Estados Unidos, apresentavam genótipos recombinantes em relação aos arquétipos clonais I, II e III (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; DUBEY et al., 2007, 2007a, 2007b; DUBEY et al., 2010, RAJENDRAN et al., 2012; PENA et al., 2013).

A genotipagem de *T. gondii* utilizando marcadores genéticos na PCR-RFLP tem gerado informação valiosa para revelar a diversidade do parasito. As vantagens destes marcadores são a facilidade de utilização e a alta resolução na identificação de isolados do protozoário. Eles foram originalmente desenvolvidos com base na sequência de polimorfismo de DNA das linhagens clonais I, II e III (SU et al., 2006).

A partir de 2006, pesquisadores começaram a utilizar os marcadores SAG1, SAG3, BTUB e GRA6, além do SAG2 para genotipagem de isolados de *T. gondii* (DUBEY et al., 2006a,b). Em 2007, foram acrescentados os marcadores C22-8, C29-2, L358, PK1 e Apico, totalizando 10 marcadores (DUBEY et al., 2007; VELMURUGAN et al., 2009).

Na América do Norte e Europa predominam os genótipos dos Tipos I, II e III, mas apesar da limitada diversidade genética, os três genótipos apresentam diferentes virulências em camundongos. O genótipo Tipo I é altamente virulento para camundongos, enquanto que os dos Tipos II e III são menos virulentos e altamente cistogênicos, resultando em infecções que persistem cronicamente (DUBEY et al., 2008a).

Na França, Richomme et al. (2009) estudaram 21 isolados de javalis selvagens (*Sus scrofa*) de duas regiões do país. A genotipagem dos isolados foi realizada utilizando três marcadores genéticos (SAG1, SAG2 e GRA7) e os resultados revelaram que todos os isolados pertenciam à linhagem arquétipo Tipo II.

Estudos relatam que os isolados de *T. gondii* no Brasil e em outros países da América do Sul são biológica e geneticamente distintos dos isolados encontrados na América do Norte e Europa (DUBEY et al., 2006, 2007,a; 2008,a; BELFORT-NETO et al., 2007; BEZERRA et al., 2012, BELTRAME et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2012, PENA et al., 2013).

Rajendran et al. (2012) observaram, em pesquisa realizada nas Américas Central e do Sul, com 164 isolados de *T. gondii* de animais, uma alta diversidade genética entre as populações do parasito.

No Brasil, a avaliação dos genótipos de *T. gondii* em animais foi realizado pela primeira vez por Dubey et al. (2002a) utilizando um único marcador genético, o SAG2. Os isolados apresentaram genótipos Tipos I e III. O material pesquisado foi em amostras de galinhas caipiras infectadas naturalmente e procedentes do interior do estado de São Paulo. Posteriormente, vários outros estudos relacionados à genotipagem de isolados do protozoário em outros animais foram realizados.

Pesquisa realizada por dos Santos et al. (2005) analisaram sete isolados de *T. gondii* obtidos de tecidos de suínos do Estado de São Paulo, através da PCR-RFLP. Cinco destes isolados foram caracterizados como Tipo III e outros dois, como Tipo I, utilizando o marcador SAG2.

Na América do Norte e Europa, a maioria das infecções humanas estudadas é causada por cepas do Tipo II, que também são comuns em animais usados para consumo nestas regiões. Em contraste, vários genótipos diferentes de *T. gondii* estão associados com a infecção grave em seres humanos na América do Sul (SIBLEY et al., 2009). Em relação ao curso clínico da toxoplasmose, alguns estudos demonstram uma maior gravidade da doença na América do Sul quando comparado a Europa e América do Norte. A doença ocular é cinco vezes mais comum em crianças com toxoplasmose congênita, identificadas pela triagem neonatal no Brasil do que em crianças identificadas pela triagem pré-natal ou neonatal na Europa (GILBERT, 2009).

Cavalcante et al. (2006), no estado do Ceará, utilizaram seis marcadores (SAG2, SAG3, GRA6, L363, cS10-A6 e cB21-4), para a genotipagem do parasito em cabras. Apenas 5,9% dos animais eram soropositivos e, destes, somente dois isolados foram obtidos, os quais apresentaram genótipos recombinantes, diferentes dos Tipos I, II e III, originalmente isolados na Europa e Estados Unidos.

No sul do Brasil, Dubey et al. (2007) obtiveram 19 isolados de *T. gondii* de 50 galinhas caipiras de propriedades rurais de cinco municípios do RS (Pelotas, Canguçu, Turuçu, Capão do Leão e Rio Grande). Os isolados foram genotipados utilizando 11 marcadores genéticos: SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt. SAG2 e Apico. Sete genótipos foram identificados, sendo cinco atípicos, um do Tipo clonal I e o outro do Tipo III.

Na cidade de Erechim (RS), Belfort-Neto et al. (2007) analisaram língua e diafragma de suínos obtidos em abatedouros da região e obtiveram a caracterização genética de quatro isolados utilizando quatro marcadores genéticos SAG2, BTUB, SAG3 e GRA6 diretamente dos tecidos, sem prova biológica. Os resultados revelaram que todos apresentavam genótipo Tipo I no SAG2. Entretanto, quando outros *locus* não ligados foram analisados, estas mesmas amostras se mostraram como Tipo III nos marcadores BTUB, SAG3 e GRA6. Uma das amostras mostrou-se Tipo II no SAG3, indicando um perfil misto.

Pena et al. (2008) estudaram as características genéticas de 125 isolados brasileiros provenientes de galinhas, cães e gatos de diferentes estados do Brasil utilizando 11 marcadores na PCR-RFLP: SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e alt. SAG2. Os dados combinados revelaram 48 genótipos, onde foi possível observar a predominância de quatro novos genótipos, designados

Brl, BrII, BrIII e BrIV. A virulência foi avaliada pela taxa de mortalidade em camundongos infectados e observaram que os genótipos Tipo Brl são altamente virulentos, Tipo BrIII não são virulentos e os Tipos BrII e BrIV possuem um grau intermediário de virulência.

Dubey et al. (2011) isolaram *T. gondii* de galinha d'Angola (*Numida meleagrides*) e de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) de MG, Brasil, utilizando 10 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico). O isolado de galinha d'Angola foi classificado como Tipo II e os isolados de coelhos foram atípicos Tipo BrII.

O isolamento do parasito em ovinos procedentes do RS revelou nove genótipos diferentes. Pela primeira vez foi confirmado genótipo Tipo II no Brasil, além do aparecimento de quatro novos genótipos atípicos, demonstrando assim, mais uma vez, uma alta diversidade do parasito em pequenos ruminantes. A caracterização genética destes isolados foi realizada por PCR/RFLP utilizando 12 marcadores genéticos: SAG1, 5'3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-6, PK1, Apico e CS3 (da SILVA et al., 2011).

Na Bahia, Bezerra et al. (2012) obtiveram 11 isolados de *T. gondii* de suínos para consumo humano. A genotipagem foi realizada com sete marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, C22-8, PK1 e Apico), sendo identificados seis genótipos atípicos (diferentes dos Tipos clonais I, II e III). Os pesquisadores ressaltaram a importância do desenvolvimento de novos marcadores genéticos para os genótipos atípicos encontrados na América do Sul.

Pena et al. (2013) isolaram o parasito de 44 galinhas caipiras no estado do Espírito Santo. A caracterização genética dos isolados foi realizada através de 12 marcadores (SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3). Onze genótipos foram encontrados e nenhum das linhagens clonais clássicas Tipo I, II e III. Em quatro isolados encontraram o genótipo Tipo Brl e, em sete, genótipos atípicos, sendo que quatro destes foram identificados pela primeira vez no Brasil.

Devido à diversidade genética entre os isolados do parasito e no intuito de alcançar uma alta resolução na identificação e avaliação dos genótipos de *T. gondii*, atualmente, têm sido utilizados 12 marcadores genéticos para genotipar amostras isoladas (SAG1, 5'3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3). Assim, uma nova associação entre mutações adaptativas do

parasito ao ambiente e seus hospedeiros permite caracterizar mais especificamente o perfil genotípico da população clonal de *T. gondii* em todo o mundo (SU et al., 2006; PENA et al., 2008).

4 Capítulo 1 - Isolamento e patogenicidade de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul¹

4.1 Introdução

Toxoplasma gondii é um protozoário de distribuição mundial, intracelular obrigatório, que infecta humanos e outros animais. As duas principais vias de transmissão do parasito são a ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados provenientes de fezes de felídeos e a ingestão de cistos viáveis presentes na carne crua ou mal cozida (DUBEY, 2010).

Entre os alimentos de origem animal, a carne suína é uma das principais fontes de infecção humana por *T. gondii* em vários países, incluindo o Brasil (DUBEY, 2009; da SILVA et al., 2010). No Rio Grande do Sul, estado do sul do Brasil, é elevado o consumo dessa carne e de embutidos feitos artesanalmente, o que pode representar uma fonte de infecção humana pelo protozoário (SPALDING et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006). A prevalência do protozoário na população é alta, chegando a 74,5% em algumas áreas (CADEMARTORI et al., 2008; SPALDING et al., 2005).

Sistemas modernos de criação industrial de suínos diminuíram a infecção por *T. gondii* em muitos países (DUBEY, 2009). No entanto, em algumas regiões do Brasil, a ocorrência de infecção pelo parasito ainda é alta, devido às criações artesanais. Estes animais podem ser infectados por *T. gondii*, através da ingestão de cistos presentes em tecidos de outros animais infectados, como roedores e aves; alimentos ou água contaminados com oocistos presentes em fezes de gatos (CAVALCANTE et al., 2006; de AZEVEDO et al., 2010; DUBEY, 2010).

¹CADEMARTORI, B.G., et al. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. **Veterinary Parasitology** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.009> (Apêndice A).

Isolados de *T. gondii* do Brasil são biológica e geneticamente diferentes dos da América do Norte e Europa (DUBEY et al., 2007; 2008, 2010, 2012; BELFORT-NETO et al., 2007; VELMURUGAN et al., 2009; BEZERRA et al., 2012).

Estudos realizados no Brasil e em outros países da América do Sul revelaram alta diversidade genética do parasito, com exceção do Chile, onde os genótipos II e III foram dominantes (LEHMANN et al., 2006; SU et al., 2006; PENA et al., 2008; RAJENDRAN et al., 2012).

No Brasil, estudos de isolamento de *T. gondii* em suínos detectaram uma positividade de 8,7% a 50,0% (DIAS et al., 2005; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006). Genótipos Tipos I, III e atípicos de *T. gondii* têm sido identificados nesses hospedeiros intermediários (BELFORT-NETO et al., 2007; VELMURUGAN et al., 2009; BEZERRA et al., 2012). Portanto, faz-se necessário a realização de estudos adicionais em outras regiões, para demonstrar a importância deste agente etiológico para a saúde pública.

O objetivo deste estudo foi isolar *T. gondii* de suínos naturalmente infectados destinados ao consumo humano e avaliar a sua patogenicidade através do bioensaio em camundongos.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Amostras de suínos naturalmente infectados

Foram coletadas amostras de sangue e tecidos (coração e cérebro) de 100 suínos criados artesanalmente, abatidos para consumo humano. A área estudada situa-se entre os paralelos 31° 21" e 31° 46"S e os meridianos 53° 06" e 51° 58"W, compreendendo cinco municípios do estado Rio Grande do Sul, Brasil: Piratini, São Lourenço do Sul, Morro Redondo, Capão do Leão e Cerrito. Os animais examinados pertenciam a 58 propriedades rurais, sendo coletados, no máximo, dois suínos por local de origem.

As amostras foram obtidas e identificadas no momento de abate dos animais, acondicionadas e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.

4.2.2 Análise sorológica

Os soros dos suínos foram examinados para detecção de anticorpos IgG para *T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), conforme técnica descrita por Camargo (1974), utilizando-se o conjugado IgG anti-suíno (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO) e lâminas fixadas com o antígeno comercial (Wama Diagnóstica®, Brasil) (cepa ME49). Em todas as reações foram utilizados controle positivo e negativo, previamente conhecidos. Foi considerada como reação positiva aquelas que apresentaram fluorescência total na diluição 1:64. As amostras reagentes foram submetidas a diluições seriadas de razão dois até a obtenção da maior diluição positiva na RIFI.

4.2.3 Bioensaio em camundongos

Tecidos (cérebro e coração) de suínos que apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* foram picados, homogeneizados e a digestão péptica foi realizada conforme descrito por Dubey (1998), com algumas alterações.

Para o bioensaio, cérebro (25 g) e coração (25g) de cada suíno foram picados (total 50g), homogeneizados com 125 vol (v/v) de solução aquosa 0,85% NaCl (salina). Adicionou-se 5 vol de pepsina ácida e a mistura foi incubada em banho-maria à 37°C por 1 hora. O homogeneizado foi filtrado através de duas camadas de gaze e centrifugado a 1200g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao sedimento solução neutralizadora (1,2% bicarbonato de sódio – pH~8.3). Novamente, o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso com 5 ml de solução, contendo 1000 UI penicilina e 100 µg de streptomina por ml de salina estéril. Duas doses de 1ml do homogeneizado dos tecidos foram inoculados intraperitonealmente, em cinco camundongos para cada suíno analisado, com intervalo de 24 horas.

Foram utilizados camundongos Swiss (25-35g), fêmeas, com aproximadamente dois meses, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram observados diariamente. Impressões de fragmentos de pulmão, cérebro e fígado dos camundongos que morreram foram examinados para a pesquisa de taquizoítos ou cistos teciduais de *T. gondii* (DUBEY, BEATTIE, 1988). Camundongos que

sobreviveram aos 45 dias pós-inoculação (p.i.) foram examinados sorologicamente para pesquisa de anticorpos para *T. gondii*, através da RIFI, com ponto de corte de 16 (CAMARGO, 1974). Esses animais foram sacrificados aos 60 dias p.i. e impressões de fragmentos de cérebro, coração e fígado foram examinados microscopicamente para a pesquisa de cistos de *T. gondii* (DUBEY, BEATTIE, 1988). Posteriormente, uma porção desses órgãos foi congelada a -70°C para extração do DNA e caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii*. Camundongos foram considerados infectados por *T. gondii* quando taquizoítos ou cistos teciduais foram encontrados em seus tecidos.

4.2.4 Análise estatística

Para a comparação entre os títulos de anticorpos e morte de camundongos inoculados utilizou-se o programa Epi-Info, versão 3.5.3, sendo empregado o Teste Exato de Fisher e consideradas diferenças com significância estatística quando $p \leq 0,05$.

4.2.5 Aspectos Éticos

A pesquisa foi realizada com a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas concedida pelo parecer nº 4632/ 2011 (Anexo A).

4.3 Resultados

Anticorpos para *T. gondii* foram encontrados em 36 dos 100 (36,0%) suínos, de 58 propriedades rurais (Tabela 1). Em 41,37% (24/58) das propriedades, foi detectado pelo menos um suíno soropositivo para o protozoário.

O parasito foi isolado de 17 (47,2%) dos 36 suínos soropositivos, com títulos ≥ 64 . A relação entre o percentual de isolamento e o título de anticorpos dos suínos, encontra-se na tabela 2.

Tabela 1 - Anticorpos para *Toxoplasma gondii* (RIFI ≥ 64) em suínos naturalmente infectados de diferentes municípios do Rio Grande do Sul

Município	Nº propriedades	Nº suínos examinados	RIFI positiva (%)
São Lourenço do Sul	39	73	16 (21,9)
Morro Redondo	4	4	3 (75,0)
Piratini	9	16	11 (68,5)
Capão do Leão	5	5	4 (80,0)
Cerrito	1	2	2 (100,0)
Total	58	100	36 (36,0)

Tabela 2 - Relação entre o título de anticorpos (RIFI ≥ 64) em suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul e o isolamento de *Toxoplasma gondii* viáveis

Título anticorpos	Nº de suínos soropositivos	Nº de suínos		
		Bioensaios	<i>T. gondii</i> isolado	%
64	16	16	4	25,0
128	5	5	3	60,0
256	3	3	2	66,7
512	7	7	4	57,1
1024	3	3	3	100,0
2048	2	2	1	50,0
Total	36	36	17	47,2

Do total de camundongos inoculados (180), 54 (30%) se infectaram e foi observado que 41,2% (7/17) das amostras isoladas foram altamente virulentas para os camundongos inoculados, causando 100% de mortalidade, do 10º ao 17º dia p.i. (Tabela 3).

Tabela 3 - Isolamento de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul
Bioensaio em camundongos

Suínos Nº	Município	RIFI Título	Camundongos com taquizoítos/ camundongos examinados (n)	Camundongos com cistos/ camundongos examinados (n)	RIFI Título	Dia da morte (p.i.)
19 (A)	São Lourenço do Sul	64	0/5	1/5	16	0
34 (B)	São Lourenço do Sul	256	0/5	2/5	32,64	0
51 (C)	São Lourenço do Sul	512	0/5	1/5	16	0
46 (D)	São Lourenço do Sul	64	0/5	1/5	16	0
54 (E)	São Lourenço do Sul	1024	0/5	4/5	64,128,256, 512	0
87 (F)	Piratini	2048	5/5	0/5	0	12,12,13,13,14
88 (F)	Piratini	512	5/5	0/5	0	15,15,16,17,17
89 (G)	Morro Redondo	1024	5/5	0/5	0	10,11,11,12,13
90 (H)	Piratini	128	0/5	2/5	16,16	0
91 (H)	Piratini	1024	5/5	0/5	0	11,12,12,13,14
92 (I)	Piratini	64	0/5	1/5	16	0
94 (J)	Piratini	64	0/5	2/5	16,16	0
95 (K)	Piratini	128	0/5	3/5	16,32,32	0
97 (L)	Capão do Leão	512	5/5	0/5	0	12,13,13,14,15
98 (M)	Cerrito	256	5/5	0/5	0	12,16,16,16,16
99 (M)	Cerrito	128	0/5	2/5	16,32	0
100(N)	Piratini	512	5/5	0/5	0	13,14,14,17,17

(A-N) – Propriedade rural de origem dos suínos

Os animais apresentaram sintomatologia entre o 8º e o 13º dia p.i. Em todos os animais foram observados sinais clínicos de toxoplasmose aguda (ascite, pêlos arrepiados, emagrecimento, diarreia, letargia) (Figura 1). Na necropsia, observaram-se lesões inflamatórias e alterações no tamanho dos órgãos, principalmente no fígado e baço (Figura 2).

Taquizoítos foram visualizados no exsudato peritoneal, pulmões e fígado de todos os camundongos mortos naturalmente a partir do 10º dia p.i. (Figura 3). Na

maioria das impressões de vísceras, o parasito foi observado extracelularmente, podendo ser visto isoladamente ou formando aglomerados de organismos.

Cepas virulentas de *T. gondii* foram encontradas nos municípios de Piratini (57,1%), Capão do Leão (14,3%), Cerrito (14,3%) e Morro Redondo (14,3%). Em São Lourenço do Sul foram encontradas cepas avirulentas do parasito.



Figura 1 - Animais bioensaiados apresentando sinais clínicos de toxoplasmose aguda.

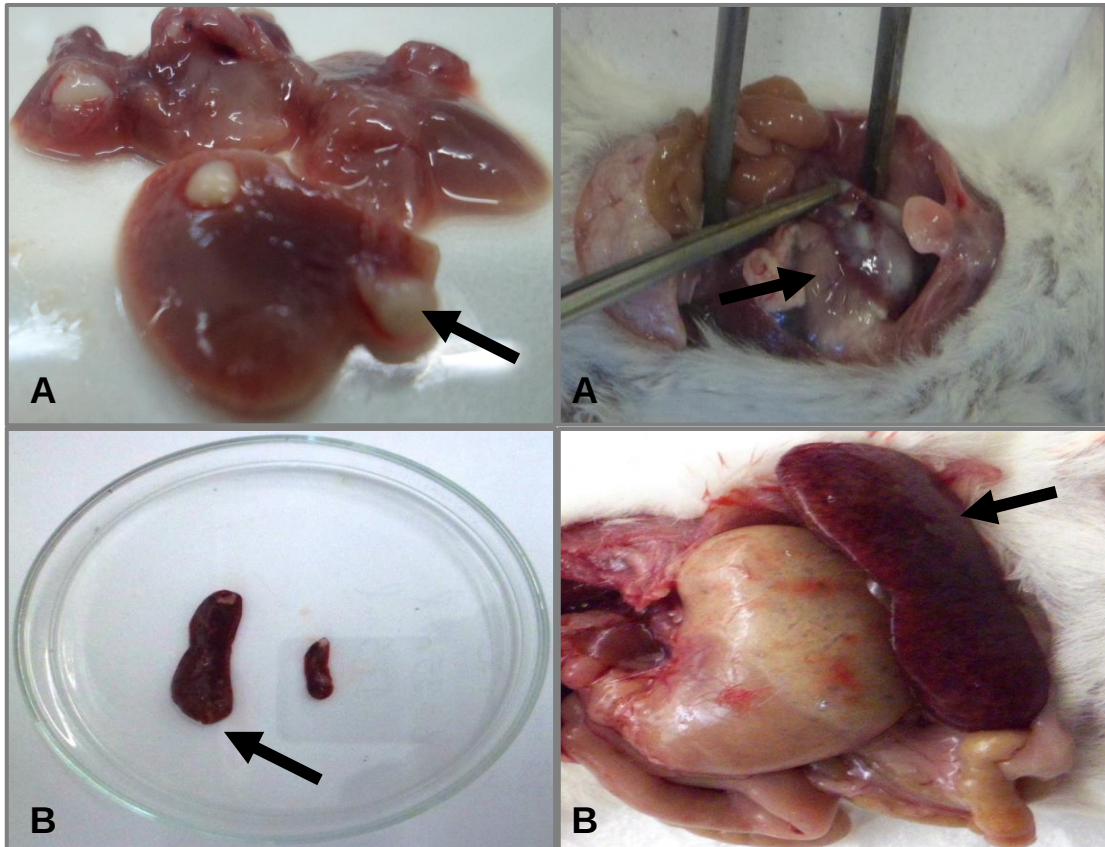


Figura 2 - Órgãos de camundongo bioensaiado apresentando lesões inflamatórias no fígado (A) e alteração no tamanho do baço (esplenomegalia) (B) na toxoplasmose aguda.

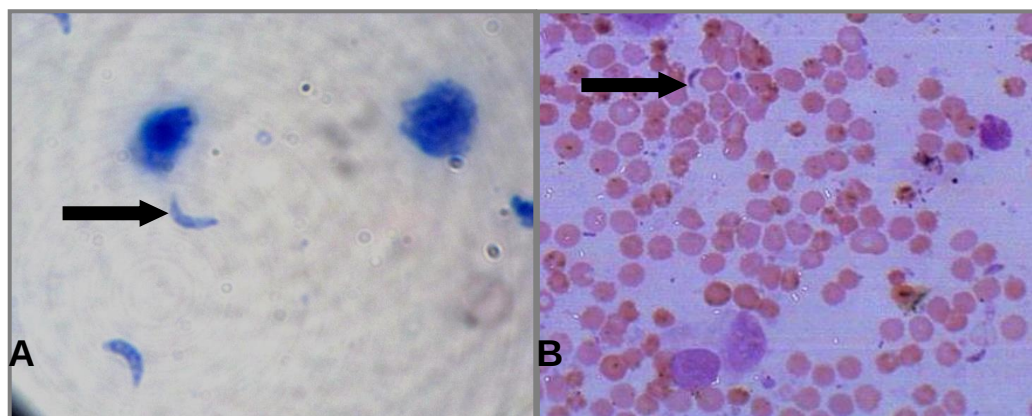


Figura 3 - Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em exsudato peritoneal (A) e pulmão (B) de camundongo infectado, corado com Giemsa (1000x) e (400x).

O material oriundo de suínos com títulos de anticorpos ≥ 256 (10/17) provocou a morte de 70,0% (35/50) dos camundongos inoculados, enquanto que o daqueles com títulos inferiores (7/17) não provocou a morte de nenhum (0/35). Essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Os demais isolados (10/17) não provocaram a morte dos camundongos, embora tenham induzido a uma resposta imune, pois esses animais apresentaram, ao final do experimento, títulos de anticorpos de 16 a 512 (Tabela 3). Cistos do parasito foram observados em *imprints* de cérebro e/ou fígado de 38,0% (19/50) desses camundongos, com diferentes tamanhos e contendo aglomerados de bradizoítos no seu interior (Figura 4).

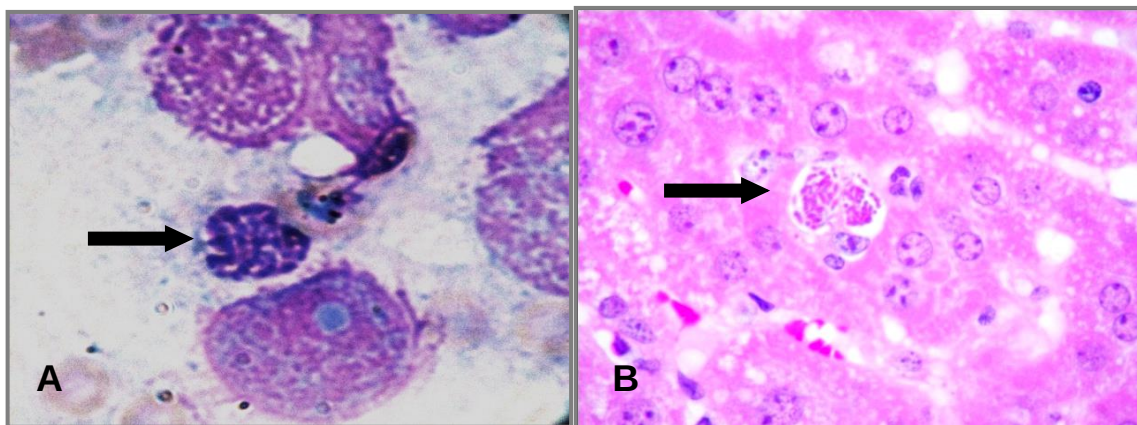


Figura 4 - Cistos de *Toxoplasma gondii* em fígado de camundongo, corados por Giemsa (1000x) (A) e Hematoxilina-eosina (400x) (B).

4.4 Discussão

A frequência de anticorpos para *T. gondii* encontrada (36,0%) é similar às médias constatadas em suínos de criação artesanal, de outros estudos do Brasil: 37,84% no Paraná (VIDOTTO et al., 1990), 50,0% no Pará (FREITAS et al., 2009), 30,76% na Bahia (BEZERRA et al., 2009), 43,7% em Rondônia (CAVALCANTE et al., 2006) e 36,2% na Paraíba (de AZEVEDO et al., 2010). Em suínos de criação industrial, esse percentual tende a ser menor (12,5-13,4%) (PIASSA et al., 2010; MURARO et al., 2010; FERNANDES et al., 2012). Isso se deve ao sistema de criação dos animais, uma vez que, os de criação artesanal têm maior risco de infecção, por estarem mais expostos às formas infectantes do protozoário, presentes no solo, na água e nos diferentes alimentos que recebem (BEZERRA et al., 2009).

Em outros países da América do Sul, como Uruguai, Peru e Argentina, a soropositividade para *T. gondii* em suínos foi de 70,2%, 32,3% e 37,8%, respectivamente (FREYRE et al., 1991; SUARÉZ-ARANDA et al., 2000; VENTURINI et al., 2004). Entretanto, não é possível realizar uma comparação entre as soroprevalências destes estudos, devido ao tipo de manejo utilizado nas propriedades, o número de animais testados, os diferentes valores do ponto de corte e testes sorológicos utilizados. Neste estudo, foi utilizada a técnica de RIFI (ponto de corte: 64) porque apresentou uma boa correlação quando comparada ao MAT (CAVALCANTE et al., 2006).

Cepas de *T. gondii* têm sido isoladas em diversos locais do Brasil, principalmente em galinhas, porém existem poucos estudos com suínos de criação artesanal. Observou-se que o percentual de isolamento do agente, a partir de suínos naturalmente infectados (47,2%), foi similar a pesquisa realizada em Portugal (40,5%), por de SOUSA et al. (2006). Entretanto, foram inferiores as taxas de isolamento de 63-98% relatadas em estudos nos Estados Unidos (DUBEY et al., 1995; 2002). Em outros trabalhos realizados no Brasil, as taxas de isolamento variaram de 8,7 a 55,0% (DIAS et al., 2005; BEZERRA et al., 2012).

De acordo com Dubey et al. (2005b) o sucesso do isolamento pode variar de acordo com o bioensaio utilizado, a quantidade de tecidos empregada e a concentração de parasitos em amostras de tecidos. Bioensaios em gatos podem aumentar a taxa de isolamento devido ao maior volume de tecido utilizado (500g ou mais), quando comparado com camundongos (DUBEY, 2009).

Verificou-se no bioensaio, que 41,2% (7/17) dos isolados de *T. gondii*, provocaram infecção aguda nos camundongos inoculados, e mostraram-se altamente virulentos (100% de mortalidade, do 10º ao 17º dia p.i.). Esses dados assemelham-se aos de Pena et al. (2008) , Mercier et al. (2010) e Wang et al. (2013). Dez dos dezessete isolados (58,8%) provocaram infecção crônica, detectada através da presença de cistos do parasito no cérebro e/ou fígado dos camundongos e soroconversão. Esse tipo de infecção pode ser devido à baixa patogenicidade das cepas de *T. gondii* para camundongos, à presença de um número reduzido de cistos no tecido inoculado ou à hipótese de que apenas uma porção dos bradizoítos tenha sido liberada dos cistos e continuado viável para infectar (DUBEY et al., 2005a).

No presente estudo, cepas virulentas de *T. gondii* foram isoladas de tecidos de suínos de diferentes propriedades dos municípios de Piratini, Morro Redondo, Capão do Leão e Cerrito. No entanto, em animais de propriedades de São Lourenço do Sul, as cepas isoladas não foram virulentas para os camundongos. Porém, para compreender a estrutura populacional de *T. gondii* neste município, é necessária a caracterização genotípica.

Nesta mesma região, em estudo de isolamento e genotipagem de *T. gondii* em galinhas de criação artesanal (DUBEY et al., 2007), foram obtidos dezoito isolados do protozoário, dos quais 27,8% causaram infecção aguda, com morte dos camundongos inoculados entre 12º e 16º dia p.i. No presente estudo com suínos, um percentual maior de isolados foi altamente virulento aos camundongos (41,2%), causando sua morte em período similar.

4.5 Conclusão

Os resultados obtidos confirmam a presença de infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos de criação artesanal no sul do Rio Grande do Sul, uma vez que um terço dos animais examinados é soropositivo para o parasito.

Os isolados de *T. gondii* são de cepas altamente virulentas para camundongos indicando o risco do consumo de carne dessa espécie animal para a população humana da região.

5 Capítulo 2 - Caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii* isolados de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul

5.1 Introdução

A infecção por *Toxoplasma gondii* é altamente prevalente no mundo. Cerca de um terço da população global está cronicamente infectada pelo protozoário (DUBEY, 2008).

O ciclo biológico do parasito é complexo, com uma fase assexuada nos hospedeiros intermediários e, outra sexuada que ocorre exclusivamente no epitélio intestinal dos felídeos. Esses animais desempenham um importante papel na transmissão da infecção, pois são os únicos hospedeiros que excretam oocistos através de suas fezes (DUBEY, 2010).

Humanos e outros animais adquirem a infecção por três vias principais: ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida, ingestão de oocistos esporulados presentes na água ou alimentos e pela passagem transplacentária de taquizoítos (DUBEY; JONES, 2008).

Pesquisas sobre isolamento e genotipagem do parasito têm sido realizadas no mundo, com a finalidade de melhor caracterizar e conhecer a sua estrutura populacional, revelando que sua distribuição genética varia entre regiões geográficas (DUBEY et al., 2007, 2007a, 2007b; PENA et al., 2008; RICHOMME et al., 2009; ZHOU et al., 2010; KHAN et al., 2011; DUBEY et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2012; PENA et al., 2013, DUBEY et al., 2013; DUBEY et al., 2014).

Na América do Norte e Europa, estudos moleculares utilizando PCR-RFLP e análise por microssatélites verificaram que nos isolados de *T. gondii*, de humanos e outros animais, predominam os genótipos dos Tipos clonais I, II e III (DUBEY et al., 2008; DUBEY, 2009; SIBLEY et al., 2009; DUBEY et al., 2012). Fenotipicamente, cepas de *T. gondii* do Tipo I são altamente virulentas para os camundongos, enquanto que as do Tipo II e III apresentam uma menor virulência

(HOWE; SIBLEY, 1995). Além disso, foi identificada uma quarta linhagem clonal, designada Tipo 12, isolada de animais selvagens na América do Norte (DUBEY et al., 2011a). No entanto, na América do Sul e, principalmente no Brasil, têm sido caracterizados, além dos Tipos clonais I, II e III, uma alta proporção de genótipos atípicos entre os isolados do parasito (DUBEY et al., 2007; 2007a; DUBEY et al., 2008a; DUBEY et al., 2010; BEZERRA et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2012; BELTRAME et al., 2012; PENA et al., 2013).

Pena et al.(2008) estudaram as características genéticas de 125 isolados do parasito provenientes de gatos, galinhas e cães de diferentes estados brasileiros. Os resultados revelaram 48 genótipos, sendo que quatro destes foram considerados linhagens clonais comuns no Brasil, sendo denominados Tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. A análise de mortalidade de camundongos infectados indicou que o BrI foi altamente virulento, BrIII foi não virulento e BrII e BrIV apresentaram virulência intermediária. No mesmo estudo, foi adicionado o marcador CS3 para avaliar a virulência em camundongos. Os autores constataram que camundongos infectados com *T. gondii* cujos isolados apresentaram alelos I ou II no *locus* CS3 estão fortemente associados com a virulência e, os que apresentaram alelo III, com a sobrevivência dos mesmos.

Entre os animais de produção de carne, os suínos representam uma importante fonte de infecção de *T. gondii* para humanos, através do consumo de carne mal cozida e/ou embutidos artesanais (DUBEY, 2009). Entretanto, a maioria dos estudos de genotipagem realizados no Brasil foi com isolados de galinhas caipiras, cães e gatos, (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007; 2007a; 2007b; PENA et al., 2008; DUBEY et al., 2010; SOARES et al., 2011; BELTRAME et al., 2012; PENA et al., 2013) e, escassos foram os com solados de suínos (dos SANTOS et al., 2005; DIAS et al., 2005; BELFORT-NETO et al., 2007; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2012).

O Brasil, por ser um país que apresenta amplitude geográfica, clima tropical e subtropical e fauna muito diversificada, pode apresentar ampla variabilidade genética entre os isolados do parasito (FERREIRA et al., 2006). Por isso, são necessários estudos em diferentes regiões, para que a geração de dados possibilite evidenciar a real importância deste agente etiológico para a saúde pública.

O Rio Grande do Sul, estado do sul do Brasil, destaca-se pela criação de suínos em pequenas propriedades. Esses animais estão expostos à infecção pelo protozoário e, o consumo de sua carne e de embutidos crus tem papel relevante na

infecção humana (PEREIRA, 2005; SPALDING et al., 2005; BELFORT-NETO et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente cepas de *T. gondii* isoladas de suínos naturalmente infectados do sul do Rio Grande do Sul, Brasil, através da PCR-RFLP. Este é o primeiro estudo de genotipagem do parasito, em suínos na região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Isolados de *T. gondii*

Um total de 17 isolados de *T. gondii* de suínos naturalmente infectados, de municípios localizados no sul estado do Rio Grande do Sul, Brasil, obtidos por Cademartori et al. (2014), foram utilizados neste estudo.

5.2.2 Extração do DNA

A extração do DNA dos isolados de *T. gondii* foi realizada com o kit Wizard® DNA Clean-Up System (Cat. A7280 – Promega, Madison, USA), de acordo com o protocolo do fabricante, após digestão prévia dos tecidos.

Para extração do DNA, 200-250mg de tecido (cérebro, pulmão ou fígado) de cada isolado foi colocado em um microtubo de 1,5mL, juntamente com 700µL de solução de lise (SDS 1%, EDTA 100mM - pH 8,0, Tris-HCl 20mM - pH 8,0, água destilada) e 20µL de proteinase K (20mg/mL). O material foi homogeneizado em um agitador tipo vortex e incubado por 12 horas em banho-maria a 37°C. Posteriormente, o lisado foi centrifugado por 5 minutos a 12000rpm. Retirou-se o sobrenadante e foi acondicionado em um novo microtubo de 1,5mL. Após o processo de digestão foi realizado a extração do DNA, a partir de 300µL do lisado, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -70°C para posterior análise.

5.2.3 PCR e *nested*-PCR

As sequências de DNA dos 17 isolados de *T. gondii* foram primeiramente amplificadas por PCR usando *primers* externos para os marcadores: 5'3' SAG2, no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. Até o momento, cinco isolados do parasito foram genotipados utilizando 12 marcadores genéticos: SAG1, 5'3' SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3, no Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). Todas as pré-amplificações foram seguidas de *nested*-PCR (HOWE et al., 1997; SU et al., 2006; PENA et al., 2008).

Para uma reação de PCR de 25 µL foram utilizados: 19,1µL de água ultrapura estéril, 2,5µL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 0,5µL da mistura de dNTPs (10,0mM cada base dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,15µL de cada *primer* (16,7µM), 1,0µL de MgCl₂ (50mM), 0,10µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL) e 1,5µL de DNA extraído.

O ciclo da PCR foi realizado com uma de desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos.

A *nested*-PCR foi realizada a partir dos produtos amplificados da PCR, utilizando-se *primers* internos, de forma individual, para cada um dos marcadores, de acordo com Howe et al. (1997), Su et al. (2006) e Pena et al. (2008).

Para uma reação de 25µL, foi utilizada uma mistura de reagentes contendo 19,1µL de água ultrapura estéril, 2,5µL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 0,5µL da mistura de dNTPs (10,0mM cada base - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,15µL de cada *primer* interno (50 µM), 1,0µL de MgCl₂ (50mM), 0,10µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL) para cada 1,5µL de amostra de DNA amplificado da PCR.

Durante a reação de *nested*-PCR, o material foi submetido a uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos.

Os produtos amplificados gerados na *nested*-PCR, juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (Ludwig Biotec®, Brasil), foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%,

em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), utilizando-se como corante gel Red (Biotium®, São Paulo). Após a separação eletroforética, o gel foi observado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização dos fragmentos gerados. A fotodocumentação foi realizada utilizando um analisador de imagem (Molecular Imaging system – Loccus Biotecnologia®, São Paulo).

A cada reação de PCR foram incluídas cepas de referência: RH (genótipo I), CTG (genótipo II), PTG (genótipo III) e controle negativo. As cepas de referência foram cedidas pela Profª Drª Solange Gennari e Drª Hilda Pena, Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP).

5.2.4 PCR-RFLP

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 3µL de cada produto de *nested*-PCR foram misturados em 17µL de reação de digestão contendo tampão NEB (1x), 0,1mg/ml de BSA, e uma unidade de cada enzima de restrição específica para cada marcador.

As amostras foram incubadas na temperatura indicada como ideal para cada enzima (Anexo B). Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,5%, juntamente com os fragmentos gerados pelas cepas controle RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), utilizando como corante gel Red (Biotium®, São Paulo). Após a separação eletroforética foi realizada a visualização dos fragmentos gerados, através do transiluminador com luz ultravioleta. Na sequência o material foi fotodocumentado, utilizando um analisador de imagem (Molecular Imaging system – Loccus Biotecnologia®, São Paulo). Os fragmentos de restrição gerados dos respectivos isolados foram comparados com os das cepas controle.

5.2.5 Análise dos resultados da genotipagem

Para a caracterização genotípica com 12 marcadores genéticos, foram analisados os perfis de bandas encontrados na digestão com as enzimas de restrição específicas para cada marcador. Os resultados obtidos foram analisados no banco de dados, ToxoDB: *an integrated Toxoplasma gondii database resource* (www.toxodb.org) e comparados com os perfis de cepas de referência (SU et al., 2006).

5.2.6 Relação entre genótipo e virulência em camundongos

Foi realizada uma análise da relação entre a caracterização genotípica e a virulência para camundongos (descrito por Cademartori et al., 2014) dos isolados de *T. gondii*.

5.2.7 Aspectos Éticos

A pesquisa foi realizada com a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas concedida pelo parecer nº 4632/ 2011 (Anexo A).

5.3 Resultados

Foi realizada a caracterização genotípica inicial dos 17 isolados de *T. gondii* de suínos naturalmente infectados, para verificar os genótipos Tipos I, II e III na região, utilizando os marcadores genéticos 5'3' SAG2, conforme Howe et al. (1997). Os isolados foram denominados TgPgBrRs19, TgPgBrRs34, TgPgBrRs46, TgPgBrRs51, TgPgBrRs54, TgPgBrRs87, TgPgBrRs88, TgPgBrRs89, TgPgBrRs90, TgPgBrRs91, TgPgBrRs92, TgPgBrRs94, TgPgBrRs95, TgPgBrRs97, TgPgBrRs98, TgPgBrRs99 e TgPgBrRs100. A análise dos fragmentos de restrição por eletroforese em gel de agarose permitiu identificar os genótipos descritos na tabela 1. Doze isolados apresentaram genótipo do Tipo III (70,6%) e cinco (29,4%), Tipo I. Nenhum isolado apresentou genótipo Tipo II.

Associando os genótipos encontrados nos isolados com a virulência em camundongos, observou-se que, dos doze isolados de *T. gondii* que apresentaram genótipo Tipo III, nove (75%) foram avirulentos e três (25%) foram virulentos; dos cinco isolados com genótipo Tipo I, quatro (80%) foram virulentos e um (20%) avirulento para os animais (Tabela 1). Os camundongos infectados com genótipos I e III, fenotipicamente virulentos, morreram entre o 10º e 17º dia pós-inoculação, após apresentarem sinais clínicos de toxoplasmose aguda. Os isolados avirulentos caracterizados com genótipos I e III, causaram infecção crônica, confirmada 60 dias pós-inoculação, pela presença de anticorpos para *T. gondii* no soro, e cistos do parasito no cérebro e fígado dos camundongos.

Nas figuras 1 e 2, encontram-se os padrões observados na PCR-RFLP no locus 5'3' SAG2 para a diferenciação dos genótipos isolados de *T. gondii* de suínos.

Tabela 1 - Caracterização genética dos isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul através da PCR-RFLP, no locus 5'3' SAG2 e fenótipo de virulência nos camundongos infectados

Isolados	Marcador PCR-RFLP	
	5'3' SAG2	Fenótipo de virulência/camundongos*
TgPgBrRs19	III	Avirulento
TgPgBrRs34	III	Avirulento
TgPgBrRs46	III	Avirulento
TgPgBrRs51	III	Avirulento
TgPgBrRs54	III	Avirulento
TgPgBrRs87	I	Virulento
TgPgBrRs88	I	Virulento
TgPgBrRs89	I	Virulento
TgPgBrRs90	III	Avirulento
TgPgBrRs91	I	Virulento
TgPgBrRs92	III	Avirulento
TgPgBrRs94	III	Avirulento
TgPgBrRs95	III	Avirulento
TgPgBrRs97	III	Virulento
TgPgBrRs98	III	Virulento
TgPgBrRs99	I	Avirulento
TgPgBrRS100	III	Virulento

*Segundo Cademartori et al. (2014)

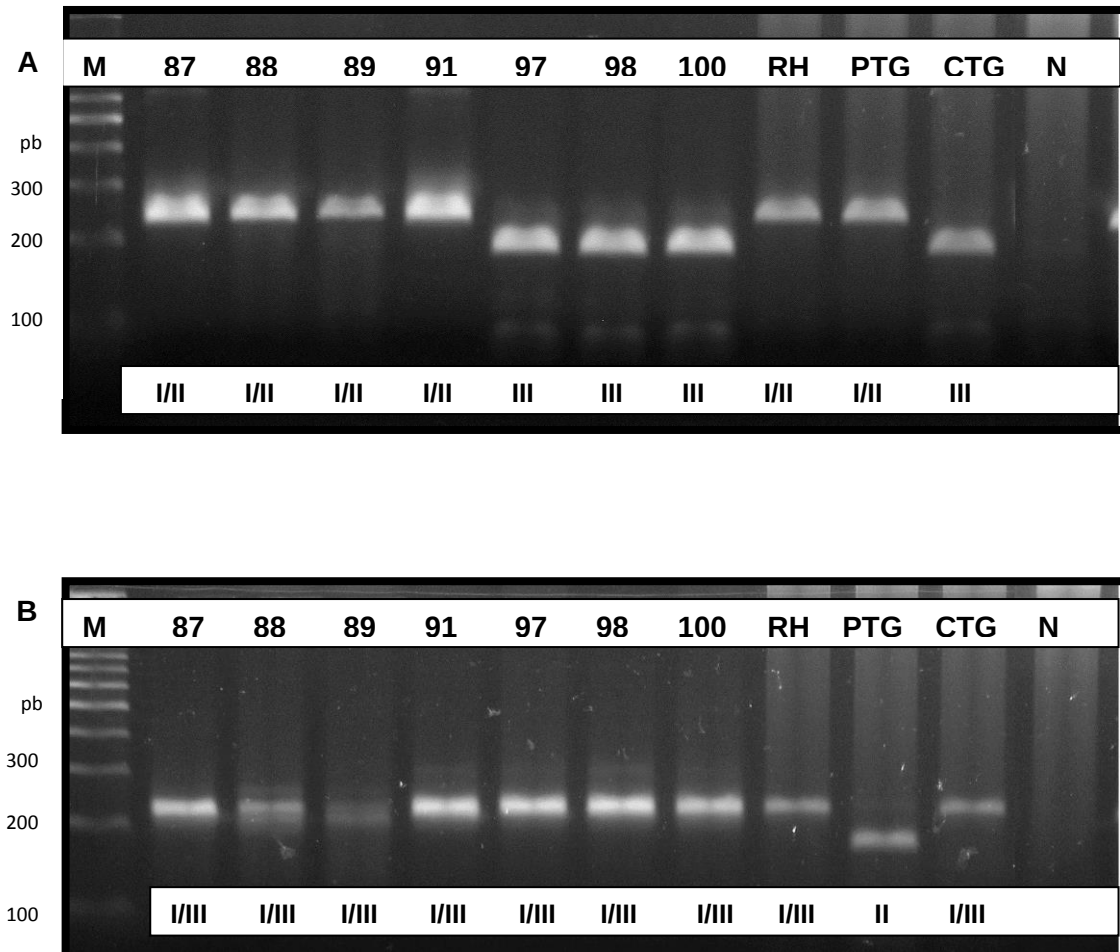


Figura 1 - PCR-RFLP do *locus* 5'3'SAG2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Mbo*I. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *Hha*I. M (marcador de peso molecular), isolados (TgPgBrRs87, 88, 89, 91, 97, 98 e 100), cepas de referência RH (genótipo I) , PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).

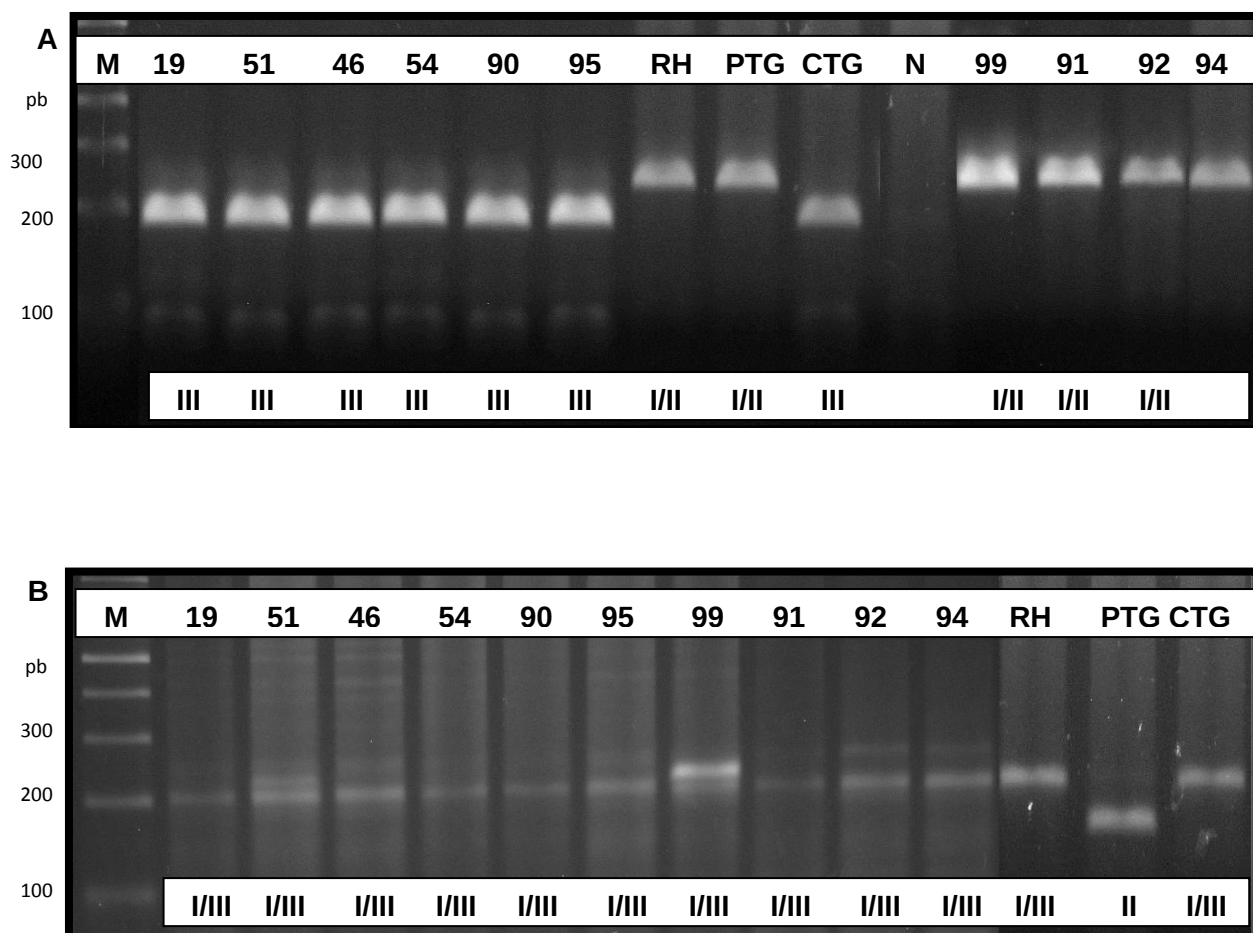


Figura 2 - PCR-RFLP do *locus* 5'3'SAG2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Mbol*. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*. M (marcador de peso molecular), isolados (TgPgBrRs19, 51, 46, 54, 90, 95, 99, 91, 92 e 94), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II), CTG (genótipo III), N (controle negativo).

A caracterização genética realizada em cinco isolados de *T. gondii* obtidos de suínos naturalmente infectados por PCR-RFLP, utilizando os marcadores genéticos específicos (SAG1, 5'3' SAG2, alt. SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3) e similaridade com outros isolados brasileiros já descritos, encontram-se na tabela 2. A fotodocumentação dos fragmentos de restrição gerados por PCR-RFLP, após a digestão com as enzimas específicas, está apresentada no apêndice B.

Entre os cinco isolados (TgPgBrRs54, TgPgBrRs87, TgPgBrRs88, TgPgBrRs89 e TgPgBrRs91), foram identificados cinco diferentes genótipos, dos quais, quatro apresentam diferentes combinações dos alelos I, II, III e novos alelos diferentes dos Tipos clonais (u-1 e u-2), sendo considerados atípicos. Entre esses, dois novos genótipos, não descritos no banco de dados ToxoDB, foram encontrados.

Tabela 2 - Caracterização genética dos isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos naturalmente infectados do Rio Grande do Sul analisados pela PCR-RFLP e identidade com outros isolados do Brasil

(continua)

Isolados	Genótipo pela PCR- RFLP												Identidade com outros isolados brasileiros (estados)	ToxoDB* RFLP
	SAG1	5' 3' SAG2 ^a	Alt. SAG2 ^b	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	Apico	CS3		
TgPgBrRs54	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	¹ TgCkBr158,161, 164 (RS) ² TgCkBr181,182 (CE) ² TgCkBr31, 56 (RJ) ¹ TgCkBr111,112 (PA)	#2
TgPgBrRs87	u-1	I	II	III	III	II	u-1	I	I	u-2	I	III	Presente estudo	Novo genótipo
TgPgBrRs88	u-1	I	II	III	III	II	u-1	I	I	u-2	I	I	Presente estudo	Novo genótipo
TgPgBrRs89	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	u-2	¹ TgCkBr147,148, 151, 154, 60,162, 163 (RS) ² TgCkBr81 (RJ)	#17 Tipo BrIV MAS
TgPgBrRs91	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	I	² TgCkBr57, 64 (RJ) ² TgCkBr97 (PR) ⁷ TgCpBr11, 23, 24 (SP) ⁴ TgOvBr3 (RS) ⁵ TgRabbitBr2 (MG)	#11 Tipo BrII

⁶TgCatBr1, 7, 9 (PR)
⁶TgCatBr51, 52, 56,
61, 68, 77, 78 (SP)
⁶TgDgBr1,13 (PR)
⁷TgCTBr02,08,09,11,
14,20,27 (MG)
⁸D3,4 (MG)
⁸CH7,9,10,11 (MG)

u-1 e u-2 são novos alelos diferentes dos Tipos clonais I, II e III

^a SAG2 marcador baseado nas extremidades 5' – 3' da sequência do gene (Howe et al., 1997)

^b novo marcador SAG2 baseado na extremidade 5' da sequência do gene mas diferente da extremidade 5' SAG2 (Su et al., 2006)

¹ TgCkBr: isolados de galinhas (Dubey et al., 2007)

²TgCkBr: isolado de galinhas (Dubey et al., 2008a)

³TgCpBr: isolados de capivaras (Yai et al., 2009)

⁴TgOvBr: isolado de ovinos (da Silva et al., 2011)

⁵TgRabbitBr: isolado de coelhos (Dubey et al., 2011)

⁶TgCatBr: isolados de gatos do estado de São Paulo (Pena et al., 2008)

⁶TgDgBr: isolados de cães do estado do Paraná (Pena et al., 2008)

⁷TgCTBr: isolados de humanos (toxoplasmose congênita) (Carneiro et al., 2013)

⁸D: isolados de cães (Silva et al., 2014)

⁸CH: isolados de galinhas (Silva et al., 2014)

*ToxoDB: <http://toxodb.org/toxo/>

O isolado TgPgBrRs54 foi caracterizado como Tipo III. Mostrou-se avirulento, infectando quatro dos cinco camundongos inoculados, mas não foi letal para nenhum deles.

Entre os genótipos atípicos, o isolado TgPgBrRs89 foi identificado como genótipo #17 (ToxoDB), MAS e a uma linhagem clonal já caracterizada no Brasil, designada Tipo BrIV. Fenotipicamente foi virulento e letal para todos os camundongos infectados.

Já, no isolado TgPgBrRs91 identificou-se o genótipo #11 (ToxoDB) e Tipo BrII, linhagem clonal do Brasil. Este genótipo apresentou fenótipo virulento.

Os dois novos genótipos obtidos, correspondem aos isolados TgPgBrRs87, TgPgBrRs88, respectivamente. Os genótipos foram caracterizados como virulentos.

A mortalidade dos camundongos infectados foi comparada entre os alelos I, III e u-2 para marcador CS3 dos cinco isolados. Para os alelos I, III e u-2 do marcador CS3, o percentual de camundongos mortos até 30 dias p.i foi de 100%, 55,5% e 100%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxa de mortalidade* dos camundongos infectados com isolados de *Toxoplasma gondii* de suínos do Rio Grande do Sul, caracterizados pelo marcador CS3

Alelos do marcador CS3	Marcador CS3		
	I	III	u-2
Nº isolados	2	2	1
Nº camundongos infectados	10	9	5
Nº camundongos mortos até 30 dias p.i	10	5	5
Mortalidade acumulada	100%	55,5%	100%

* Dados descritos por Cademartori et al. (2014)

5.4 Discussão

Os isolados genotipados neste estudo, foram de suínos de pequenas propriedades rurais do sul do Brasil, descritos por Cademartori et al. (2014).

Os primeiros estudos sobre genotipagem de *T. gondii* isolado de diferentes espécies, através da PCR-RFLP no *locus* SAG2, relataram uma estrutura populacional clonal com três linhagens predominantes, denominadas Tipos I, II e III. Os isolados dos Tipos I e II têm sido mais frequentes em humanos e os do Tipo III predominantes em animais (HOWE; SIBLEY, 1995). Utilizando esse marcador, observou-se que, dos 17 isolados genotipados, cinco (29,4%) foram caracterizados como Tipo I e doze (70,6%), como Tipo III. Não foi encontrado Tipo II entre os isolados. Santos et al. (2005) utilizando o mesmo marcador genético e tecidos de suínos do estado de São Paulo, obtiveram sete isolados, sendo cinco do Tipo III e dois do Tipo I, resultados semelhantes aos do presente estudo. Também Belfort-Neto et al. (2007), na cidade de Erechim (RS) isolaram o parasito de tecidos de suínos de abatedouros, obtendo quatro isolados, todos Tipo I. Em outras pesquisas realizadas no Brasil com galinhas caipiras, procedentes de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Rondônia (DUBEY et al., 2002a; DUBEY et al., 2003, 2003a; DUBEY et al., 2006b) e com gatos de São Paulo (PENA et al., 2006) e Paraná (DUBEY et al., 2004), utilizando a mesma técnica, foram obtidos isolados com características genéticas semelhantes às dos aqui encontrados. Resultados similares também foram obtidos em experimentos realizados em outros países da América como Perú, México e Colômbia (DUBEY et al., 2004a; DUBEY et al., 2004b; DUBEY et al., 2005c). Em Portugal, Sousa et al. (2006) identificaram, em 15 isolados de *T. gondii*, genótipo Tipo III em quatro amostras e Tipo II, em 11. Segundo os autores, os isolados são geneticamente semelhantes aos isolados nos EUA.

Segundo Howe & Sibley (1995), cepas de *T. gondii* Tipo I são classificadas como altamente virulentas para os camundongos infectados, e as dos Tipos II e III, de menor virulência para os diferentes hospedeiros, podendo levar a infecção crônica e produção de cistos teciduais. Esses dados foram confirmados neste estudo, ao constatar-se que 90% (4/5) dos isolados Tipo I mostraram-se virulentos nos camundongos infectados, enquanto que apenas 25% (3/12) do Tipo III, apresentaram a mesma característica. Isolados do Tipo III virulentos também foram

obtidos em galinhas (DUBEY et al., 2005a), assim como Tipo I não virulentos (DUBEY et al., 2004b). Se esses mesmos isolados fossem caracterizados com um número maior de marcadores genéticos, os resultados da genotipagem poderiam revelar genótipos atípicos. Segundo Dardé (2008), o aumento do número de marcadores genéticos utilizados para a genotipagem pode revelar polimorfismos únicos ou mistura de alelos clássicos em isolados anteriormente classificados como uma das três cepas clássicas.

A existência de genótipos atípicos ou recombinantes é predominante na América do Sul e, principalmente, no Brasil (RAJENDRAN et al., 2012; DUBEY et al., 2010; da SILVA et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; PENA et al., 2013). No presente estudo, além da genotipagem dos 17 isolados de suínos utilizando o marcador 5'3'SAG2, foram caracterizados, até o momento, cinco destes isolados com 12 marcadores (SAG1, 5'3' SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3). Evidenciou-se a presença de cinco genótipos distintos, dos quais um do Tipo clonal III e, quatro atípicos. Entre os atípicos, dois nunca foram descritos e, os outros já identificados nos isolados de várias regiões do Brasil.

Os resultados reforçam a hipótese de que existe uma grande variabilidade genética de *T. gondii* no Brasil, corroborando os dados obtidos em outros estudos com animais domésticos (BEZERRA et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2012; PENA et al., 2013, da SILVA et al., 2011; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; DUBEY et al., 2010), silvestres (YAI et al., 2009; PENA et al., 2011) e em humanos (CARNEIRO et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; CARNEIRO et al., 2013). A diversidade genética na América do Sul e, especialmente, no Brasil, além de alta, independe da espécie de hospedeiro estudada ou do ambiente onde vivem.

Estudos realizados com isolados de *T. gondii* da Europa e EUA têm mostrado predominância de genótipos clonais clássicos I, II e III (DUBEY, 2009; SIBLEY et al., 2009; DUBEY et al., 2012). No Brasil, embora a maioria dos genótipos caracterizados seja atípico, os Tipos clonais já foram descritos em vários hospedeiros (DUBEY et al., 2008a; da SILVA et al., 2011; DUBEY et al., 2010; YAI et al., 2009; DUBEY et al., 2007; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). No presente estudo, o isolado TgPgBrRs54 apresentou alelo III em todos os marcadores analisados, caracterizado como Tipo clonal III e avirulento para os camundongos infectados. Foi

similar aos isolados TgCKBr181, TgCKBr182 (Ceará); TgCKBr31, TgCKBr56 (Rio de Janeiro); TgCKBr111, TgCKBr112 (Pará) e TgCkBr158, TgCkBr161, TgCkBr164 (Rio Grande do Sul) caracterizados por Dubey et al. (2008a; 2007) em estudos com galinhas caipiras.

O isolado TgPgBrRs89 apresentou similaridade com os isolados de galinhas caipiras (TgCKBr147, TgCKBr148, TgCKBr151, TgCKBr154, TgCKBr160, TgCKBr162, TgCKBr163) procedentes da mesma região do Rio Grande do Sul estudada e com outro (TgCKBr81), do estado do Rio de Janeiro, já descritos por Dubey et al. (2007; 2008a), sendo caracterizado como genótipo #17 (ToxoDB), MAS e BrIV, linhagem clonal do Brasil (PENA et al., 2008). Segundo os autores, a linhagem BrIV foi determinada após a análise das taxas de mortalidade em camundongos infectados com isolados brasileiros, onde foram identificados quatro Tipos (BrI, BrII, BrIII, BrIV). O Tipo BrI seria o mais virulento, BrIII não virulento e os BrII e BrIV de virulência intermediária. Embora, a classificação do BrIV seja de virulência intermediária, no presente estudo, o isolado identificado com essa linhagem, foi letal para todos os camundongos infectados (100% de mortalidade). O BrIV pode ser uma linhagem comum circulante no Rio Grande do Sul, uma vez que já foi identificado em animais de diferentes espécies, no entanto, estudos adicionais deverão ser realizados.

O Tipo BrII identificado no isolado TgPgBrRs91, já foi anteriormente encontrado em isolados de animais domésticos e silvestres e; de humanos em várias localidades do Brasil. Foi similar aos isolados de ovinos do Rio Grande do Sul (TgOvBr3), de gatos do Paraná e São Paulo (TgCatBr1, 7, 9, 51, 52, 56, 61, 68, 77, 78), de galinhas do Rio de Janeiro, Paraná e Minas Gerais (TgCkBr57, 64, 97; CH7, 9, 10, 11), de cães do Paraná e Minas Gerais (TgDgBr1, 13; D3, 4) e de coelhos de Minas Gerais (TgRabbitBr2) (da SILVA et al., 2011; PENA et al., 2008; DUBEY et al., 2008a; SILVA et al., 2014; DUBEY et al., 2011). Além de apresentar o mesmo genótipo de isolados de capivaras de vida livre de São Paulo (TgCpBr11, 23) e, de humanos de Minas Gerais (TgCTBr02, 08, 09, 11, 14, 20, 27) (YAI et al., 2009; CARNEIRO et al., 2013). O encontro dessa linhagem em diferentes espécies de animais e humanos em grande parte do país evidencia que esteja amplamente disseminada.

No presente estudo, todos os camundongos infectados pelo BrII morreram antes dos 30 dias pós-inoculação, corroborando com os achados de Pena et al. (2008) que determinaram a variação da taxa de mortalidade de zero a 100%.

Nos novos genótipos identificados dos isolados TgPgBrRs87 e TgPgBrRs88 não foram observadas diferenças fenotípicas de virulência, pois ambos mataram 100% dos camundongos infectados. No entanto, segundo Pena et al. (2008) e Yai et al. (2009), a virulência só pode ser inferida quando vários isolados do mesmo genótipo são testados em camundongos. Outro fator relevante que deve ser avaliado é que as infecções causadas em camundongos com diferentes isolados de *T. gondii*, podem ser diferentes das causadas em outros hospedeiros. A virulência é estritamente contextual, um isolado do parasito que causa doença grave em um hospedeiro pode ser assintomático em outro (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). No Brasil, nenhuma evidência concreta existe de correlação da virulência de *T. gondii* em camundongos e diferentes genótipos com a evolução clínica durante a infecção humana (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011).

Pena et al. (2008), em estudo sobre a estrutura populacional e virulência em camundongos de isolados de *T. gondii* do Brasil, adicionaram o marcador CS3 para avaliar a virulência nesses animais. Segundo os autores, camundongos infectados com *T. gondii* cujos isolados apresentarem alelos I ou II no *locus* CS3 estão fortemente associados com a virulência e, os com alelo III, relacionados à sobrevivência dos mesmos. No presente estudo, os isolados TgPgBrRs88 e TgPgBrRs91 apresentaram alelo I e foram virulentos (100% de mortalidade) para os camundongos infectados e, o isolado TgPgBrRs54 apresentou alelo III e não foi letal para os animais, corroborando com os achados desses autores. Resultados similares também foram encontrados por Yai et al. (2009), em isolados de capivaras de vida livre de São Paulo e em isolados de animais domésticos e humanos de Minas Gerais (SILVA et al., 2014).

5.5 Conclusão

Existe alta diversidade genética de *Toxoplasma gondii*, infectando naturalmente suínos de criação artesanal no sul do Rio Grande do Sul.

A genotipagem revelou dois novos genótipos de *T. gondii*, altamente virulentos para camundongos, além dos já descritos no Brasil.

Há correlação positiva entre a presença dos alelos I e III no *locus* CS3 e a virulência nos camundongos infectados.

6 Conclusões gerais

Toxoplasma gondii encontra-se difundido na região sul do Rio Grande do Sul, uma vez que mais de um terço dos suínos de criação artesanal apresentam anticorpos para o parasito.

A espécie suína representa importante fonte de infecção por *T. gondii* para o homem, sendo o agente isolado de suínos abatidos para consumo humano, na região.

Suínos da região estão infectados por cepas de *T. gondii* com alta variabilidade genética, sendo detectados novos genótipos atípicos, além dos Tipos BrII, BrIV e do Tipo clonal III.

Os isolados identificados como genótipos atípicos mostraram-se altamente virulentos para camundongos.

A diversidade genética encontrada nos isolados de *T. gondii* do sul do Rio Grande do Sul foi similar à de outras regiões do Brasil.

A associação entre a ocorrência dos alelos I e III no *locus* CS3 e a virulência em camundongos foi confirmada nas amostras analisadas.

Referências

ALMEIDA, M. A. B.; ALENCAR-JUNIOR, L. R.; CARMO, G. M. I.; do CARMO, G. M. I.; de ARAUJO, W. N.; GARCIA, M. H. O.; REIS, A. K. V.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SPERB, A. F.; BRANCO, N.; FRANCO, R. M. B.; HATCH, D. L. Surto intrafamiliar de toxoplasmose, Santa Vitória do Palmar – RS. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, n. 6, p. 1 - 7, 2006.

AMARAL, V.; MACRUZ, R. *Toxoplasma gondii*: isolamento de amostra a partir diafragma de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo – Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 36, p. 47 - 54, 1969.

ASSI, M. A.; ROSENBLATT, J. E.; MARSHALL, W. F. Donor-transmitted toxoplasmosis in liver transplant recipients: a case report and literature review. **Transplant Infectious Disease**, v. 9, n. 2, p. 132-136, 2007.

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.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55 - 62, 2003.

BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, D.; BELFORT Jr., R. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 111 - 114, 2007.

BELTRAME, M. A. V.; PENA, H. F. J.; TON, N. C.; LINO, A. J. B.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; PEREIRA, F. E. L. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 225 - 230, 2012.

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

BEZERRA, R. A.; PARANHOS, E. B.; DEL'ARCO, A. E.; ALBUQUERQUE, G. R. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 78 - 80, 2009.

BONNA, I. C. F.; FIGUEIREDO, F. B.; COSTA, T.; VICENTE, R. T.; SANTIAGO, C. A. D.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B. MILLAR, P. R.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Estudo soropidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, p. 186 - 189, 2006.

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.

CADEMARTORI, B. G.; FARIAS, L. M. J. F.; OLIVEIRA, F. C.; QUEVEDO, P.; OLIVEIRA, P. A.; RAMOS, T. S.; ROCHA, A. S. R.; RUAS, J. L.; FARIAS, N. A. R. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. **Veterinary Parasitology** (in press), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.009>, 2014.

CADEMARTORI, B. G.; FARIAS, N. A. R.; BROD, C. S. Seroprevalence and risk factors to *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women of Pelotas, south of Brazil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 10, p. 30 - 35, 2008.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143 - 169, 1974.

CARNEIRO, A. C. A. V.; ANDRADE, G. M. Q.; JANUÁRIO, J. N.; CARELLOS, E. V. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; FERREIRA, A. M.; PINHEIRO, B. V.; COSTA, J. G. L.; VÍTOR, R. W. A. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* obtido de casos humanos de toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 2, p. 30, 2011.

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.; VÍTOR, R. W. A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly

diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 901 - 907, 2013.

CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; GOUVEIA, A. M. G.; GUIMARÃES, A. S.; MARQUES, A. P. R.; VILAS-BOAS, L. S.; VITOR, R. W. A. Seroprevalence and risk factors of caprine toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.160, p. 225 - 229, 2009.

CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D.; DUBEY, J. P.; RUIZ, V. L. A.; DIAS, R. A.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brasil. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 863 - 864, 2006.

CORREA, R.; CEDEÑO, I.; de ESCOBAR, C.; FUENTES, I. Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p.9 - 11, 2008.

COSTA, D. G. C.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. S. A.; SANTANA, S. C.; MAGALHÃES, F. J. R.; LIMA FILHO, C. D. F.; RIBEIRO, V. O.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n.3, p. 679 - 680, 2012.

da SILVA, A. V.; da SILVA, R. C.; ZAMPROGNA, T. O.; *Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira. **Sciência Médica**, v. 20, p. 120 - 130, 2010.

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

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

de AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. J.; ALVES, C. J.; GUIMARÃES FILHO, A. A. M.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S. M. Prevalence de anti-*Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* antibodies in Swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 80 - 84, 2010.

de BUHR, K.; LUDEWIG, M.; FEHLHABER, K. *Toxoplasma gondii* – seroprevalence - current results in German swine herds. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v. 59, p. 5 - 8, 2008.

de LIMA, J. T. R.; AHID, S. M. M.; BARRÊTO, R. A.; PENA, H. F. J.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p.81 - 86, 2008.

de MOURA, A. B.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D. L.; MARANA, E. R. M. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 54 - 56, 2007.

de OLIVEIRA, L. N.; COSTA, L. M.; de MELO, C. B.; SILVA, J. C. R.; BEVILAQUA, C. M. L.; AZEVEDO, S. S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO, D. A. F. V.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast Region of Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 235 - 237, 2009.

de SOUSA, S.; AJZEMBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L.; CORREIA da COSTA, J. M.; DARDÉ, M. L.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 133 - 136, 2006.

DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; SERRURIER, B.; DARDÉ, M. L.; CARME, B. Case report: Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living Jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 195 - 197, 2008.

DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; de CASTRO, M. V.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 185 - 189, 2005.

dos SANTOS, C. B. A.; de CARVALHO, A. C. F. B.; RAGOZO, A. M. A.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; YAI, L. E. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 207 - 211, 2005.

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs – the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89 - 103, 2009.

DUBEY, J. P., 2010. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1 - 313.

DUBEY, J. P.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; HERRERA-VALENZUELA, V. H.; ORTIZ-DIAZ, J. J.; OLIVEIRA, S.; VERMA, S. K.; CHOUDHARY, S.; KWOK, O. C. H.; SU, C. A new atypical genotype mouse virulent strain of *Toxoplasma gondii* isolated from the heart of a wild caught puma (*Felis concolor*) from Durango, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 674 - 677, 2013.

DUBEY, J. P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.V.; BANDINI, L.A.; KWOK, O.C.H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana. South America identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, p. 1559 - 1566, 2007a.

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

DUBEY, J. P.; BHAIYAT, M. I.; de ALLIE, C.; MACPHERSON, C. N. L.; SHARMA, R. N.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; LEHMANN, T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 557 - 560, 2005a.

DUBEY, J. P.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; BUTLER, E.; CARSTENSEN, M.; YU, L.; SU, C. Isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from the gray wolf (*Canis lupus*). **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 685 - 690, 2013.

DUBEY, J. P.; GAMBLE, H. R.; HILL, D.; SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. **Journal of Parasitology**, v. 88, p.1234 - 1238, 2002.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; VIANNA, M. C. C. B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 36 – 40, 2006b.

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, 2007b.

DUBEY, J. P.; GOMEZ-MARIN, J. E.; BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M. C. B.; HILL, D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 67-72, 2005c.

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

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DA SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003a.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C. B.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, p.1082 - 1093, 2005.

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

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C. H.; PIERCE, V.; KELLY, K.; DULIN, M.; THULLIEZ, P.; IWUEKE, C.; SU, C. Endemic Toxoplasmosis in Pigs on a Farm in Maryland: Isolation and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 94, p.36 - 41, 2008.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C. B.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: Risk Assessment to Consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p.1082 - 1093, 2005b.

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.; LEVY, M. Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; DAH, E.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1015-1018, 2004a

DUBEY, J. P.; MORALES, E. S.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 411- 413, 2004b.

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

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J. P.; PASSOS, L. M.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L. R.; GENNARI, S. M.; SU, C. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from Feral Guinea Fowl (*Numida meleagris*) and Domestic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 842 – 845, 2011.

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

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

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

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N. C.; LUNA, L. A.; RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J. B.; KWOK, O. C. H.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; POWELL, E. C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 48 - 53, 1995.

DUBEY, J. P.; VAN WHY, K.; VERMA, S. K.; CHOUDHARY, S.; KWOK, O. C. H.; KHAN, A.; BEHINKE, M. S.; SIBLEY, L. D.; FERREIRA, L. R.; OLIVEIRA, S.; WEAVER, M.; STEWART, R.; SU, C. Genotyping *Toxoplasma gondii* from wildlife in Pennsylvania and identification of natural recombinants virulent to mice. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 74 - 84, 2014.

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

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M. J.; THOMAS, N. J.; BECKMEN, K. B.; SINNETT, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P.A.; MCFEE, W. E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O. C. H.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E.B.; ZHOU, H.; FELIX, T. A.; SU, C. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1139 - 1149, 2011a.

EDELHOFER, R.; PROSSINGER, H. Infection with *Toxoplasma gondii* during Pregnancy: Seroepidemiological Studies in Austria. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 18 - 26, 2010.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190 - 196, 2010.

ESMERINI, P.O.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 8 - 13, 2010.

FARREL, R. L.; DOCTON, F. L.; CHAMBERLAIN, D. M.; COLE, C. R. Toxoplasmosis: *Toxoplasma* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 13, p. 181 - 185, 1952.

FERNANDES, E. F. T. S.; FERNANDES, M. F. T. S.; KIM, P. C. P.; de ALBUQUERQUE, P. P. F.; NETO, O. L. S.; SANTOS, A. S.; de MORAES, É. P. B. X.; de MORAIS, E. G. F.; MOTA, R. A. Study of *Toxoplasma gondii* in slaughtered swine in the state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, p. 690 - 691, 2012.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection Genetics and Evolution**, v. 6, p. 23 - 31, 2006.

FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; DE MATTOS, C. C. B.; de MATTOS, L. C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 190 - 195, 2011.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R.; PELISSARI-SANT'ANA, V.; LOPES, C. W. *Toxoplasma gondii* in brains of pigs commercialized at the Municipality of Campos dos Goytacazes in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 33 - 36, 2006.

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

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P.; RAMOS, O. S.; ISHIZUKA, M. M. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos sem inspeção em Belém. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 61, p. 1230 - 1232, 2009.

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

FREYRE, A.; COLOMBO, A.; D'ANGELO, J. M.; FALCÓN, J. Prevalencia de la infección toxoplásmica en cerdos en el Uruguay y su significación zoonotica. **Avances em Ciencias Veterinarias**, v. 6, p. 166 - 171, 1991.

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.

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

GILBERT, R. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 305 – 311, 2009.

HILL, D.E.; HALEY, C.; WAGNER, B.; GAMBLE, H.R.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the U.S. swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). **Zoonosis Public Health**. 57, p.53 - 59, 2009.

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411 - 1414, 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p.1561 - 1566, 1995.

HUONG, L.T.T.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from Vietnam. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 951 - 952, 2007.

HUTCHISON W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 206, p. 961 - 962, 1965.

JACOBS, J.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 23 - 28, 1960.

JANKU, J. Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microptalme avec parasite dans la rétine. **Casopis Lekaruv Ceskych**, v. 62, p. 1021 - 1027, 1923.

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

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 fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 645 - 655, 2011.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal of Parasitology**, v 38, p. 1359 - 1370, 2008.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J.; de CRAEYE, S.; VEREIJKEN, P.; JONGERT, E. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183 - 190, 2008.

KIM, J. H.; KANG, K.; KANG, W. C.; SOHN, H. J.; JEAN, Y. H.; PARK, B. K.; KIM, Y.; KIM, D.Y. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 147 - 151, 2009.

KLUN, I.; VUJANIĆ, M.; YERA, H.; NIKOLIĆ, A.; IVOVIĆ, V.; BOBIĆ, B.; BRADONJIĆ, S.; DUPOUY-CAMET, J.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1 - 6, 2011.

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 of the United States of America**, v.103, n. 30, p. 11423 - 11428, 2006.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, p. 37 - 58, 1980.

LOGES, L. A.; CADEMARTORI, B. G.; FARIAS, N. A. R. Seroprevalence and associated factors to *Toxoplasma gondii* infection in blood donors in Southern Brazil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 14, n. 1, p. 27 - 31, 2012.

LUFT, B. J.; BROOKS, R. G.; CONLEY, F. K.; MCCABE, R. E.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Journal of the American Medical Association**, v. 252, p 913 - 917, 1984.

LUFT, B. J.; CONLEY, F.; REMINGTON, J. S.; LAVERDIERE, M.; LEVINE, J. F. STRANDBERG, D. A.; WAGNER, K. F.; CRAVEN, P. C.; FILE, T. M.; RICE, N.; MEUNIER-CARPENTIER, F. Outbreak of central-nervoussystem toxoplasmosis in western Europe and North America. **Lancet**, v. 1, n. 8328, p.781 - 784. 1983.

MERCIER, A.; DEVILLARD, S.; NGOUBANGOYE, B.; BONNABAU, H.; BAÑULS, A. L.; DURAND, P.; SALLE, B.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, e876, 2010.

MURARO, L. S.; CARAMORI JÚNIOR, J. G.; AMENDOEIRA, M. M. R.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; VICENTE, R. T.; NEVES, L. B.; NICOLAU, J. L.; IGARASHI, M.; MOURA, S. T. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum e Diamantino, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 254 - 255, 2010.

OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, G. P. Prevalence of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 324 - 326, 2009.

OLIVEIRA, K. R.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H.; da SILVA, R. C.; GOTTSCHALK, S. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos criados sob condições rústicas na microrregião de Registro – SP, pelo método de aglutinação direta (MAD). **Veterinária e Zootecnia**, v.14, p.169 - 175, 2007.

ORTEGA-PACHECO, A.; ACOSTA VIANA, K. Y.; GUZMÁN-MARÍN, E.; SEGURA-CORREA, J. C.; ÁLVAREZ-FLEITES, M.; JIMÉNEZ-COELLO, M. Prevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* in Fattening Pigs Farm from Yucatan, Mexico. **BioMed Research International**, v. 2, p.1 - 7, 2013.

PAPPEN, F. G. **Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) em ovinos da região sul do Estado do Rio Grande do Sul.** 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

PENA, H. F. J.; VITALIANO, S. N.; BELTRAME, M. A. V.; PEREIRA, F. E. L.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from

chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 111 - 117, 2013.

PENA, H. F.; MARVULO, M. F.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P. A.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 377 – 381, 2011.

PEREIRA, I. **Soroprevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em suínos e características epidemiológicas de estabelecimentos de criação industrial e artesanal da região de Pelotas-RS**. 2005. 99f. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PIASSA, F. R.; de ARAÚJO, J. B.; da ROSA, R. C.; MATTEI, R. J.; da SILVA, R. C.; LANGONI, H.; da SILVA, A. V. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non- certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 152 - 156, 2010.

PINKERTON, H.; WEINMAN, D. *Toxoplasma* infection in man. **Archives of Pathology**, v. 30, p.374 - 392, 1940.

POLJAK, Z.; DEWEY, C. E.; FRIENDSHIP, R. M.; MARTIN, S. W.; CHRISTENSEN, J.; OJKIC, D.; WU, J.; CHOW, E. Pig and herd level prevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario finisher pigs in 2001, 2003, and 2004. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 72, p. 303 - 310, 2008.

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

RAWAL, B. D. Toxoplasmosis: a dye-test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 61 - 63, 1959.

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

ROSA, L. D.; de MOURA, A. B.; TREVISANI, N.; MEDEIROS, A. P.; SARTOR, A. A.; de SOUZA, A. P.; BELLATO, V. *Toxoplasma gondii* antibodies on domiciled cats from Lages municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 268 - 269, 2010.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunochemical phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, p. 660 - 663, 1948.

SANTOS, C. B. A.; CARVALHO, A. C. F. B.; RAGOZO, A. M. A.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; YAI, L. E. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from fattening pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 207 - 211, 2005.

SANTOS, L. M. J. F.; CADEMARTORI, B. G.; de ALMEIDA, I. A.; KRAUSE, E.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L. Ocorrência de anticorpos IgG anti - *Toxoplasma gondii* em soros de cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal de Pelotas – Rs- Brasil. **The Biologist (Lima)**, v. 10, n. 2, Suplemento Especial, 2012.

SANTOS, L. M. J. F.; DAME, M. C. F.; CADEMARTORI, B. G.; CUNHA FILHO, N. A.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in water buffaloes and meat cattle in Rio Grande do Sul State, southern Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 58, n. 3, p. 334 - 336, 2013.

SANTOS, T. R.; COSTA, A. J.; TONIOLLO, G. H.; LUVIZOTTO, M. C. R.; BENETTI, A. H.; SANTOS, R. R.; MATTA, D. H.; LOPES, W. D. Z.; OLIVEIRA J. A.; OLIVEIRA, G. P. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p.324 - 326, 2009.

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

SILVA, J. M. L. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária do estado de Minas Gerais**, n. 12, p. 425 - 428, 1959.

SILVA, L. A.; ANDRADE, R. O.; CARNEIRO, A. C. A. V.; VITOR, R. W. A. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animal and humans in southeastern Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n.2, e90237, 2014.

SOARES, H. S.; AHID, S. M. M.; BEZERRA, A. C. D. S.; PENA, H. F. J.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 211 - 214, 2009.

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

SOBRAL, C. A.; AMENDOEIRA, M. R. R.; TEVA, A.; PATEL, B. N.; KLEIN, C. H. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous brazilian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 37 - 41, 2005.

SOUZA, C. O.; TASHIMA, N. T.; da SILVA, M. A.; TUMITAN, A. R. P. Estudo transversal de toxoplasmose em alunas de um curso superior da região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 59 - 61, 2010.

SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; KLEIN, C. H.; RIBEIRO, L. C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 173 - 177, 2005.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo Nota preliminare pel. **Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo**, n. 3, p. 109 - 112, 1908.

SROKA, J.; CENCEK, T.; ZIOMKO, I.; KARAMON, J.; ZWOLIN'SKI, J. Preliminary assessment of ELISA, MAT and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, p. 545 - 549, 2008.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, p. 1 - 11, 2010.

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

SUARÉZ-ARANDA, F.; GALISTEO, A. J.; HIRAMOTO, R. M.; CARDOSO, R. P. A.; MEIRELES, L. R.; MIGUEL, O.; ANDRADE, H. F. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v.91, p. 23 - 32, 2000.

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

THIPTARA, A.; KONGKAEW, W.; BILMAD, U.; BHUMIBHAMON, T.; ANAN, S. Toxoplasmosis in piglets. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p.336 - 338, 2006.

UENO, T. E. H., GONÇALVES, V. S. P., HEINEMANN, M. B., DILLI, T. L. B., AKIMOTO, B. M., DE SOUZA, S. L. P., GENNARI, S. M. AND SOARES, R. M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 547 - 552, 2009.

VELMURUGAN, G. V.; SU, C.; DUBEY, J. P. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 95 - 99, 2009.

VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; RAMBEAUD, M.; BASSO, W.; UNZAGA, J. M.; PERFUMO, C. J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and outdoor farm in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 161 - 165, 2004.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R.; FREIRE, R. L. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina –PR. **Semina Ciências Agrárias**, v. 11, p. 53 - 59, 1990.

VILLARI, S.; VESCO, G.; PETERSEN, E.; CRISPO, A.; BUFFOLANO, W. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 1 - 8, 2009.

WANG, L.; CHEN, H.; LIU, D.; HUO, X.; GAO, J.; SONG, X.; XU, X.; HUANG, K.; LIU, W.; WANG, Y.; LU, F.; LU, Z. R.; LUO, Q.; SHEN, J. Genotypes and Mouse Virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from Animals and Humans in China. **PLOS one**, v. 8, e53483, 2013.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in man and swine – An investigation of the possible relationship. **Journal of the American Medical Association**, v. 161, p. 229 - 232, 1956.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 87, p. 211 - 216, 1954.

WOLF, A.; COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an Encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. **Bulletin of the Neurological Institute of New York**, v. 6, p. 306 - 371, 1937.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. H. Toxoplasmic encephalomyelitis: A new case of granulomatous encephalitis due to a protozoon. **American Journal of the Pathology**, v. 15, p. 657 - 694, 1940.

XAVIER, G. A.; CADEMARTORI, B. G.; CUNHA FILHO, N. A.; FARIAS, N. A. R. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in the south of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 1, p. 25 - 30, 2013.

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

ZHOU, P.; N. I. E. H.; ZHANG, L. X.; WANG, H. Y.; YIN, C. C.; SU, C.; ZHU, X. Q.; ZHAO, J. L. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates from Pigs in China. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 1027 - 1029, 2010.

Apêndices



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Short Communication

Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil

B.G. Cademartori^{a,*}, L.M.J.F. Santos^a, F.C. Oliveira^a, P. Quevedo^a, P.A. Oliveira^a,
T.S. Ramos^a, A.S.R. Rocha^b, J.L. Ruas^c, N.A.R. Farias^a

^a Institute of Biology, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Brazil

^b Department of Life Sciences and Health, School of Pharmacy, Catholic University of Pelotas, Brazil

^c Regional Veterinary Diagnosis Laboratory, School of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2013

Received in revised form 27 January 2014

Accepted 7 February 2014

Keywords:

Toxoplasma gondii

Isolation

Pathogenicity

Pigs

ABSTRACT

This study reported a serological test for *Toxoplasma gondii* infection in 100 pigs from 58 rural farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Thirty-six pigs were seropositive (IFAT $\geq 1:64$). Bioassays were performed for all 36 seropositive pigs, and 17 isolates were obtained (47.2%). Seven of these isolates (41.2%) were highly pathogenic to mice, as clinical signs of acute infection were observed, and tachyzoites were found in the peritoneal exudates, livers, and lungs. The remaining 10 isolates were able to establish a chronic infection in mice, therefore, they were not highly virulent. The results of this study indicate that pork is a potential source of *T. gondii* transmission to humans.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The parasite *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan with a worldwide distribution, and it infects both humans and animals. The two principal routes of transmission for this organism are the ingestion of oocysts from cat feces in contaminated food or water and the ingestion of viable cysts found in raw or undercooked meat (Dubey, 2010).

In several countries, including Brazil, pigs are considered the most important reservoir among food animals of *T. gondii* that is transmitted to humans (Dubey, 2009; da Silva et al., 2010). In Rio Grande do Sul, State in southern Brazil, the consumption of pork and handmade sausages is high, and they are therefore important sources of protozoan infection (Dias et al., 2005). The prevalence of the

parasite in the population is high, reaching 74.5% in some areas (Spalding et al., 2005; Cademartori et al., 2008).

Modern pig production systems, particularly those in which intensive management has been adapted, have decreased *T. gondii* infection in many countries (Dubey, 2009). However, in some regions of Brazil, the incidence of parasitic infection is high due to the practice of rearing pigs outdoors. These animals can be infected by *T. gondii* through the ingestion of sporulated oocysts from contaminated environments or water or through the ingestion of cysts contained in the tissues of infected animals, such as rodents and birds (Cavalcante et al., 2006; de Azevedo et al., 2010; Dubey, 2010).

T. gondii isolates from Brazil are biologically and genetically different from those in North America and Europe (Dubey et al., 2007, 2008, 2012; Belfort-Neto et al., 2007; Velmurugan et al., 2009; Bezerra et al., 2012). Previous studies of isolates from Brazil and other South American countries have demonstrated high genetic variability, with the exception of Chile, where genotypes II and III are

* Corresponding author. Tel.: +55 5333214812.

E-mail address: biacademartori@yahoo.com.br (B.G. Cademartori).

dominant (Lehmann et al., 2006; Su et al., 2006; Pena et al., 2008; Rajendran et al., 2012). Previous studies performed using the tissues of naturally infected pigs in Brazil revealed that isolation rates varied between 8.7% and 50.0% (Dias et al., 2005; Frazão-Teixeira et al., 2006). Additionally, genotypes I and III as well as atypical *T. gondii* have been identified (Belfort-Neto et al., 2007; Velmurugan et al., 2009; Bezerra et al., 2012). Therefore, it is necessary to perform additional studies in other regions to demonstrate the importance of this etiological agent to public health.

The aims of this study were to isolate *T. gondii* from naturally infected pigs intended for human consumption and to evaluate the pathogenicity of the parasite using bioassays in mice.

2. Materials and methods

2.1. Naturally infected pigs

Blood and tissue samples (heart and brain) of 100 pigs that were slaughtered for human consumption were collected. The study area spanned five municipalities in Rio Grande do Sul in southern Brazil, including Piratini, São Lourenço do Sul, Morro Redondo, Capão do Leão and Cerrito, which are located between latitudes 31°21" and 31°46"S and meridians 53°06" and 51°58"W. The examined animals originated from 58 farms, and at most, two pigs from each farm were collected.

2.2. Serological examination

The sera were examined for *T. gondii* IgG antibodies using an indirect fluorescence antibody test (IFAT) according to the technique described by Camargo (1974) using an anti-pig IgG conjugate antibody (Sigma Chemical®) and a commercial antigen obtained from WAMA Diagnostic® (ME 49 strain of *T. gondii*). The cut-off used was 1:64, and positive samples were tested until the maximum dilution titer was reached. Positive and negative control pig sera, maintained in the Parasitology Laboratory, were included in all reactions.

2.3. Bioassay of pig tissue homogenates in mice

The brains and hearts of pigs that were serologically positive for *T. gondii* were minced, homogenized and prepared using peptic digestion, as described by Dubey (1998).

For the bioassays, each pig brain (25 g) and heart (25 g) was ground (total of 50 g) and homogenized in 125 vol (v/v) of aqueous 0.85% NaCl (saline). This homogenate was then mixed with 5 vol of acidic pepsin, and the mixture was incubated in a shaking water bath for 1 h at 37 °C. The homogenate was then filtered through two layers of gauze and centrifuged at 1200 × g for 10 min. After centrifugation, the supernatant was discarded, and a neutralizing solution (1.2% sodium bicarbonate, pH ~ 8.3) was added to the sediment. The material was centrifuged again, and the supernatant was discarded. The sediment was resuspended in 5 mL of an antibiotic solution that contained 1000 IU of penicillin and 100 µg streptomycin per mL of sterile saline. This product was intraperitoneally inoculated in five Swiss

Table 1

Toxoplasma gondii antibodies (IFAT) in naturally infected pigs from different municipalities in southern Brazil.

Municipality	No. of farms	No. of pigs examined	IFAT positive (%)
São Lourenço do Sul	39	73	16 (21.9)
Morro Redondo	4	4	3 (75.0)
Piratini	9	16	11 (68.5)
Capão do Leão	5	5	4 (80.0)
Cerrito	1	2	2 (100.0)
Total	58	100	36 (36.0)

Webster (25–35 g) mice at a dose of 1 mL per mouse; mice were given a second identical injection 24 h after the first inoculation.

Swiss Webster female mice with an average age of two months were obtained from the Central Animal Facility of the Faculty of Veterinary Medicine at the Federal University of Pelotas. The animals were observed daily, and tissues sections of the lung, brain and liver of the mice that died were examined for the presence of *T. gondii* tachyzoites and/or tissue cysts (Dubey and Beattie, 1988). The survivors were bled on day 45 post-inoculation (pi), and a 1:16 dilution of serum from each mouse was tested for *T. gondii* antibodies by IFAT (Camargo, 1974). The mice were sacrificed at day 60 p.i., and heart, brain and liver smears were examined microscopically for tissue cysts (Dubey and Beattie, 1988). Furthermore, portions of the brain, lung and liver of these specimens were frozen at –70 °C for future DNA extraction and genetic characterization of the *T. gondii* isolates. The mice were considered to be infected with *T. gondii* when tachyzoites or tissue cysts were found in their tissues.

2.4. Statistical analyses

Epi-Info (version 3.5.3) was used for the statistical analyses, and Fisher's exact test was used to compare antibody titers and mortality among the inoculated mice. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

2.5. Ethical consideration

This research was conducted with the approval of the Ethics Committee on Animal Experimentation at the Federal University of Pelotas, as granted by Opinion No. 4632/2011.

3. Results

Antibodies to *T. gondii* were found in 36 of 100 (36.0%) pigs from 58 small farms (Table 1). *T. gondii* was isolated from tissues of 17 of the 36 (47.2%) pigs with IFAT titers of 1:64 or higher (Table 2).

We observed that 41.2% (7/17) of the isolates were highly pathogenic in the inoculated mice. These animals became ill between days 8 and 13 p.i. and died by days 10–17 p.i. (Table 3). Tachyzoites were observed in the peritoneal exudates, lungs and livers of all dead mice beginning at day 10 p.i. Most of the visceral impressions demonstrated extracellular parasites, which could be observed alone or in

Table 2Relationship between the antibody titer (IFAT) in naturally infected pigs in southern Brazil and the isolation of viable *Toxoplasma gondii*.

Antibody titer	No. of seropositive pigs	No. of pigs		
		Bioassayed	<i>T. gondii</i> isolated	%
64	16	16	4	25.0
128	5	5	3	60.0
256	3	3	2	66.7
512	7	7	4	57.1
1024	3	3	3	100.0
2048	2	2	1	50.0
Total	36	36	17	47.2

clusters. The pathogenic isolates were obtained from the municipalities of Piratini (57.1%), Capão do Leão (14.3%), Cerrito (14.3%) and Morro Redondo (14.3%). Pathogenic strains of *T. gondii* were not found in pigs from the São Lourenço do Sul municipality (Table 3).

The pig tissue homogenates with antibody titers of $\geq 1:256$ (10/17) caused death in 70.0% (35/50) of the inoculated mice, where as those with lower titers (7/17) did not cause death (0/35). This difference was found to be statistically significant ($p < 0.01$).

The remaining isolates (10/17) did not kill the mice, although they induced an immune response, as demonstrated by the antibody titers (1:16 to 1:512) at the end of the experiment (Table 3). Parasitic cysts were observed in the brain and/or liver smears of 38.0% (19/50) of these mice; these cysts were of different sizes and contained bradyzoite agglomerates.

4. Discussion

The observed frequency of *T. gondii* antibodies (36.0%) is similar to the averages commonly reported for pigs from small farms in other Brazilian studies (Vidotto et al., 1990; Cavalcante et al., 2006; de Azevedo et al., 2010). In technified pig farms, the prevalence is noticeably lower

(12.5–13.4%) (Piassa et al., 2010; Muraro et al., 2010; Fernandes et al., 2012) as a result of the safer animal husbandry systems used on commercial farms. Swine from small farms are at a greater risk for infection because they are more exposed to the infective forms of the parasite that are present in soil, water and various foods (Bezerra et al., 2009).

The seropositivity for *T. gondii* in other South American countries has been reported to be 70.2% in Uruguay, 32.3% in Peru and 37.8% in Argentina (Freyre et al., 1991; Suárez-Aranda et al., 2000; Venturini et al., 2004). However, a close comparison of seroprevalence among these studies is not possible because of the type of management practices used on the farms, the number of animals tested, the different cut-off values and the different serologic tests used. In this study, we used the IFAT technique (cut-off value, 1:64) because it shows a good correlation when compared with MAT (Cavalcante et al., 2006). This technique enabled us to obtain a significant isolation frequency in mice.

Strains of *T. gondii* have been isolated in many areas of Brazil and are often obtained from chickens; however, few studies involving local pig farms have been performed. In the present study, the primary objective was to isolate *T. gondii* from pigs on small farms. The observed isolation rate

Table 3Isolation of *T. gondii* from naturally infected pigs from Rio Grande do Sul, Brazil.

Pigs no.	Municipality	IFAT titer	Bioassay in mice			
			Mice with tachyzoites/mice examined (n)	Mice with cysts/mice examined (n)	IFAT titer	Day of death (p.i.)
19 (A)	São Lourenço do Sul	64	0/5	1/5	16	0
34 (B)	São Lourenço do Sul	256	0/5	2/5	32, 64	0
51 (C)	São Lourenço do Sul	512	0/5	1/5	16	0
46 (D)	São Lourenço do Sul	64	0/5	1/5	16	0
54 (E)	São Lourenço do Sul	1024	0/5	4/5	64, 128, 256, 512	0
87 (F)	Piratini	2048	5/5	0/5	0	12, 12, 13, 13, 14
88 (F)	Piratini	512	5/5	0/5	0	15, 15, 16, 17, 17
89 (G)	Morro Redondo	1024	5/5	0/5	0	10, 11, 11, 12, 13
90 (H)	Piratini	128	0/5	2/5	16, 16	0
91 (H)	Piratini	1024	5/5	0/5	0	11, 12, 12, 13, 14
92 (I)	Piratini	64	0/5	1/5	16	0
94 (J)	Piratini	64	0/5	2/5	16, 16	0
95 (K)	Piratini	128	0/5	3/5	16, 32, 32	0
97 (L)	Capão do Leão	512	5/5	0/5	0	12, 13, 13, 14, 15
98 (M)	Cerrito	256	5/5	0/5	0	12, 16, 16, 16, 16
99 (M)	Cerrito	128	0/5	2/5	16, 32	0
100 (N)	Piratini	512	5/5	0/5	0	13, 14, 14, 17, 17

(A–N) – farm of origin of the pigs.

of *T. gondii* from naturally infected pigs (47.2%) is similar to that reported in Portugal (47.5%) in a study conducted by de Sousa et al. (2006). However, this rate is lower than the 63–98% isolation rate from pigs reported in the USA (Dubey et al., 1995, 2002). In other studies conducted in Brazil, the isolation rates ranged from 8.7 to 55.0% (Dias et al., 2005; Bezerra et al., 2012).

According to Dubey et al. (2005a), successful isolation can vary depending on the bioassay and the amount of tissue used as well as the concentration of the parasite in the tissue samples. Bioassays in cats often show increased isolation rates when compared with mice due to the greater volume of tissue (500 g or more) that is bioassayed (Dubey, 2009).

In this bioassay, 41.2% (7/17) of *T. gondii* isolates were highly pathogenic to mice (causing 100% mortality between days 10 and 17 p.i.). These results are similar to those of other studies, which have reported that a high percentage of isolates from Brazil are pathogenic in mice (Pena et al., 2008; Mercier et al., 2010). Ten of the 17 isolates (58.8%) caused chronic infection, which was determined by the presence of parasitic cysts in the brains and/or livers of the mice as well as seroconversion. This type of infection may have been due to the low pathogenicity of the *T. gondii* strains, a smaller number of cysts in the inoculated tissue, or the possibility that only a small number of bradyzoites were released from the cysts during peptic digestion and organ maceration, while the remaining bradyzoites remained within the cysts causing a persistent infection. (Dubey et al., 2005b).

In the present study, pathogenic strains of *T. gondii* were isolated from the tissues of pigs originating from different small farms in the municipalities of Piratini, Morro Redondo, Capão do Leão and Cerrito. However, in animals from farms in São Lourenço do Sul, the strains isolated were nonpathogenic. This finding may be related to the zoonotic potential of the area and the cultural differences between the regions (Kijlstra and Jongert, 2008); however, to understand the nature of the *T. gondii* population in this study, it is necessary to determine the genotypes of the *T. gondii* strains in the region evaluated.

In the same region, a study that isolated and genotyped *T. gondii* in free-range chickens (Dubey et al., 2007) obtained 18 parasitic isolates, and 27.8% of these isolates caused acute infections and death in inoculated mice on days 12–16 p.i. In the present study, a higher percentage of isolates obtained from pigs were aggressively pathogenic to the mice (41.2%) and caused death within a similar time frame. These results confirm the existence of *T. gondii* environmental contamination in Rio Grande do Sul in southern Brazil.

The fact that more than one-third of the examined animals tested seropositive for *T. gondii*, coupled with the isolation of highly pathogenic strains, indicates that there is a risk associated with the consumption of pork obtained from pigs raised on small farms in this region. These data underscore the need for education and further measures to prevent the consumption of these meats and/or sausages without pre-treatment (e.g., cooking, freezing or curing) to kill the parasite.

Conflict of interest statement

The authors of this study state that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank Dr Hilda Fátima de Jesus Pena and Dr Solange Maria Gennari, Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brazil, for their support during the execution of the study.

References

- Belfort-Neto, R., Nussenblatt, V., Rizzo, L., Muccioli, C., Silveira, C., Nussenblatt, R., Khan, A., Sibley, L.D., Belfort Jr., R., 2007. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79 (1), 111–114.
- Bezerra, R.A., Paranhos, E.B., Del'Arco, A.E., Albuquerque, G.R., 2009. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18 (3), 78–80.
- Bezerra, R.A., Carvalho, F.S., Guimarães, L.A., Rocha, D.S., Maciel, B.M., Wenceslau, A.A., Lopes, C.W.G., Albuquerque, G.R., 2012. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolation from pigs intended for human consumption in Brazil. *Vet. Parasitol.* 189, 153–161.
- Cademartori, B.G., Farias, N.A.R., Brod, C.S., 2008. Seroprevalence and risk factors to *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women of Pelotas, south of Brazil. *Rev. Panam. Infectol.* 10 (4), 30–35.
- Camargo, M.E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Patol. Clín.* 10 (3), 143–169.
- Cavalcante, G.T., Aguiar, D.M., Chiebao, D., Dubey, J.P., Ruiz, V.L.A., Dias, R.A., Camargo, L.M.A., Labruna, M.B., Gennari, S.M., 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brazil. *J. Parasitol.* 92 (4), 863–864.
- da Silva, A.V., da Silva, R.C., Zamprogna, T.O., 2010. *Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira. *Sci. Med.* 20 (1), 120–130.
- de Azevedo, S.S., Pena, H.F.J., Alves, C.J., Guimarães Filho, A.A.M., Oliveira, R.M., Maksimov, P., Schares, G., Gennari, S.M., 2010. Prevalence de anti-*Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19 (2), 80–84.
- Dias, R.A.F., Navarro, I.T., Ruffolo, B.B., Bugni, F.M., Castro, M.V., Freire, R.L., 2005. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 47 (4), 185–189.
- Dubey, J.P., 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.* 74 (1), 75–77.
- de Sousa, S., Ajzenberg, D., Canada, N., Freire, L., Correia da Costa, J.M., Dardé, M.L., Thulliez, P., Dubey, J.P., 2006. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet. Parasitol.* 135 (2), 133–136.
- Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in pigs – the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164 (2–4), 89–103.
- Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–313.
- Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 220.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Powell, E.C., 1995. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J. Parasitol.* 81, 48–53.
- Dubey, J.P., Gamble, H.R., Hill, D., Sreekumar, C., Romand, S., Thulliez, P., 2002. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *J. Parasitol.* 88, 1234–1238.
- Dubey, J.P., Hill, D.E., Jones, J.L., Hightower, A.W., Kirkland, E., Roberts, J.M., Marcet, P.L., Lehmann, T., Vianna, M.C.B., Miska, K., Sreekumar, C., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., Gamble, H.R., 2005a. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J. Parasitol.* 91 (5), 1082–1093.
- Dubey, J.P., Bhaiyat, M.I., de Allie, C., Macpherson, C.N.L., Sharma, R.N., Sreekumar, C., Vianna, M.C.B., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Miska, K.B., Hill, D.E., Lehmann, T., 2005b. Isolation, tissue distribution, and

- molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada. *J. Parasitol.* 91 (3), 557–560.
- Dubey, J.P., Sundar, N., Gennari, S.M., Minervino, A.H.H., Farias, N.A., da R., Ruas, J.L., dos Santos, T.R.B., Cavalcante, G.T., Kwok, O.C.H., Su, C., 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.* 143 (2), 182–188.
- Dubey, J.P., Hill, D.E., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C.H., Pierce, V., Kelly, K., Dulin, M., Thulliez, P., Iwueke, C., Su, C., 2008. Endemic toxoplasmosis in pigs on a farm in Maryland: isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 94 (1), 36–41.
- Dubey, J.P., Hill, D.E., Rozeboom, D.W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L.R., Kwok, O.C., Su, C., 2012. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Vet. Parasitol.* 188 (1–2), 14–18.
- Fernandes, E.F.T.S., Fernandes, M.F.T.S., Kim, P.C.P., de Albuquerque, P.P.F., Neto, O.L.S., Santos, A.S., de Moraes, É.P.B.X., de Moraes, E.G.F., Mota, R.A., 2012. Study of *Toxoplasma gondii* in slaughtered swine in the state of Pernambuco, Brazil. *J. Parasitol.* 98 (3), 690–691.
- Frazão-Teixeira, E., de Oliveira, F.C.R., Pelissari-Sant'Ana, V., Lopes, C.W.G., 2006. *Toxoplasma gondii* em encéfalos de suínos comercializados no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 15 (1), 33–36.
- Freyre, A., Colombo, A., D'Angelo, J.M., Falcón, J., 1991. Prevalencia de la infección toxoplásmica en cerdos en el Uruguay y su significación zoonótica. *Av. Cienc. Vet.* 6, 166–171.
- Kijlstra, A., Jongert, E., 2008. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* 38 (12), 1359–1370.
- Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P., 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11423–11428.
- Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A.L., Durand, P., Salle, B., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (11), e876.
- Muraro, L.S., Caramori Júnior, J.G., Amendoeira, M.M.R., Pereira, J.A., Oliveira Filho, J.X., Vicente, R.T., Neves, L.B., Nicolau, J.L., Igarashi, M., Moura, S.T., 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum e Diamantino, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19 (4), 254–255.
- Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38 (5), 561–569.
- Piassa, F.R., de Araújo, J.B., da Rosa, R.C., Mattei, R.J., da Silva, R.C., Langoni, H., da Silva, A.V., 2010. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non-certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19 (3), 152–156.
- Rajendran, C., Su, C., Dubey, J.P., 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect. Genet. Evol.* 12, 359–368.
- Spalding, S.M., Amendoeira, M.R.R., Klein, C.H., Ribeiro, L.C., 2005. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (2), 173–177.
- Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 36, 841–848.
- Suárez-Aranda, F., Galisteo, A.J., Hiramoto, R.M., Cardoso, R.P.A., Meireles, L.R., Miguel, O., Andrade, H.F., 2000. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Vet. Parasitol.* 91, 23–32.
- Velmurugan, G.V., Su, C., Dubey, J.P., 2009. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. *J. Parasitol.* 95 (1), 95–99.
- Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Venturini, L., Rambeaud, M., Basso, W., Unzaga, J.M., Perfumo, C.J., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and outdoor farm in Argentina. *Vet. Parasitol.* 124, 161–165.
- Vidotto, O., Navarro, I.T., Giraldi, N., Mitsuka, R., Freire, R.L., 1990. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina – PR. *Semina Ciênc. Agrar.* 11, 53–59.

Apêndice B – Fotodocumentação da PCR-PFLP dos cinco isolados de *T. gondii* de suínos, caracterizados com os marcadores genéticos específicos.

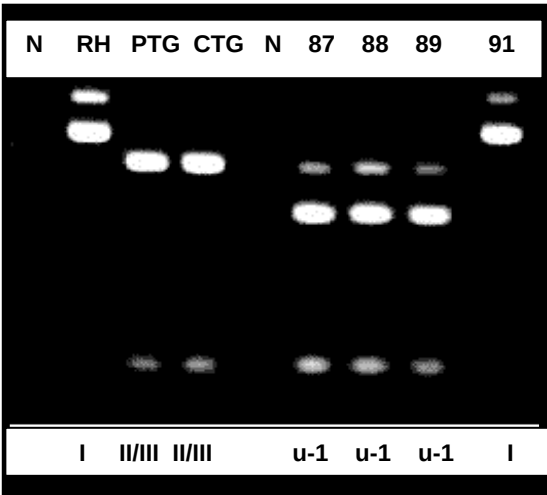


Figura 1 - PCR-RFLP do *locus* SAG1, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com as endonucleases *Sau96I* e *HaeIII*. Isolados (TgPgBrRs87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II/III) e CTG (genótipo II/III), N (controle negativo) u-1(alelo diferente dos Tipos clonais I, II e III).

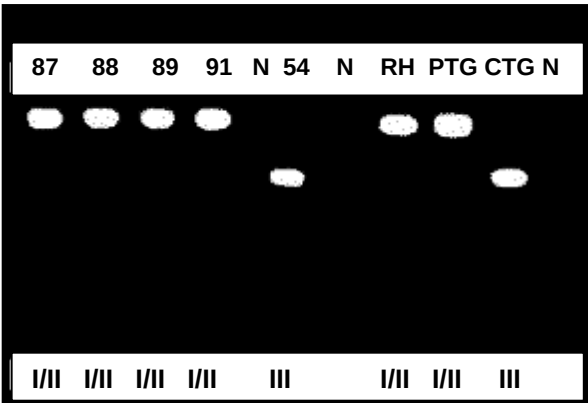


Figura 2 - PCR-RFLP do *locus* 5' SAG2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com a endonuclease *MboI*. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I/II), PTG (genótipo I/II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).

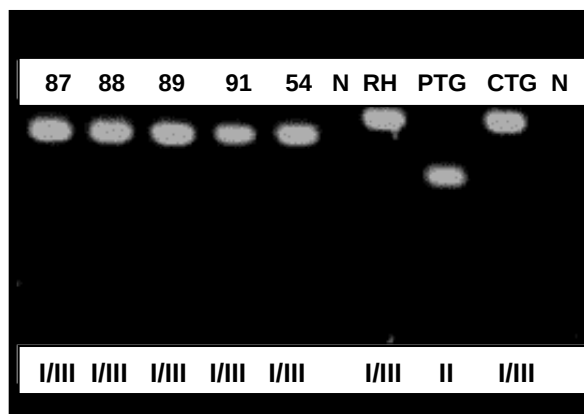


Figura 3 - PCR-RFLP do *locus* 3' SAG2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com a endonuclease *HhaI*. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I/III), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo I/III), N (controle negativo).

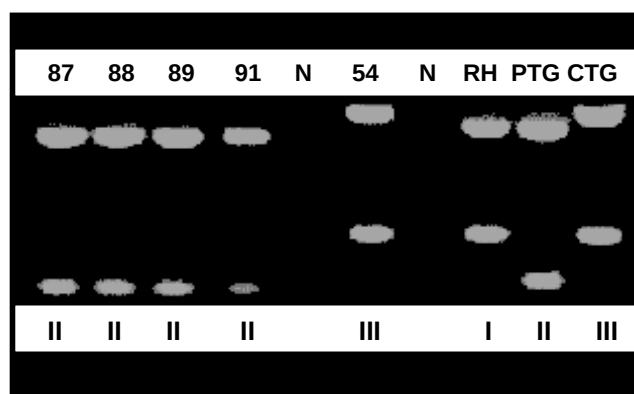


Figura 4 - PCR-RFLP do *locus* alt. SAG2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com as endonucleases *HinfI* e *TaqI*. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).

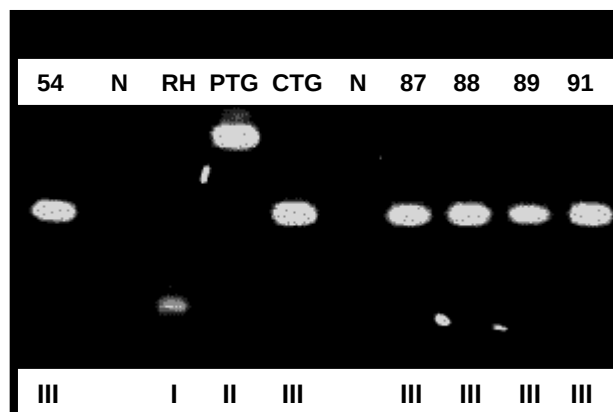


Figura 5 - PCR-RFLP do *locus* SAG3, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com a endonuclease *NciI*. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).

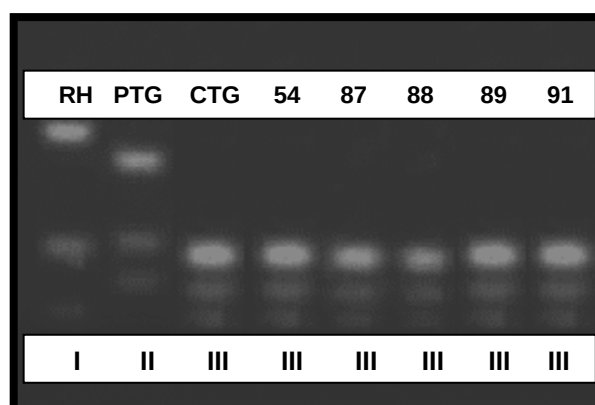


Figura 6 - PCR-RFLP do *locus* BTUB, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com as endonucleases *BsiEI* e *TaqI*. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III).



Figura 7 - PCR-RFLP do *locus* GRA6, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com a endonuclease *Mse*I. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).

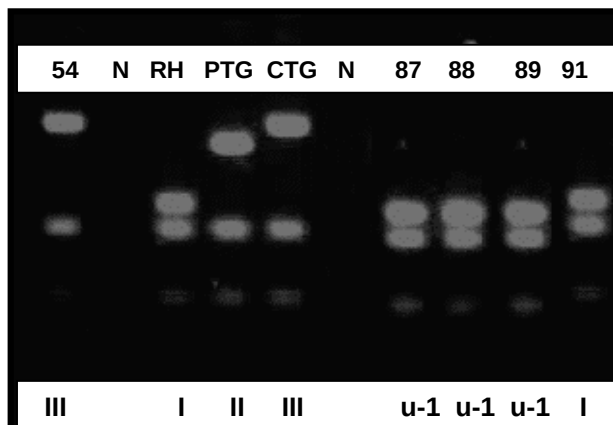


Figura 8 - PCR-RFLP do *locus* c22-8, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com as endonucleases *Bsm*AI e *Mbo*II. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo), N (controle negativo), u-1 (alelo diferente dos tipos clonais I, II e III).

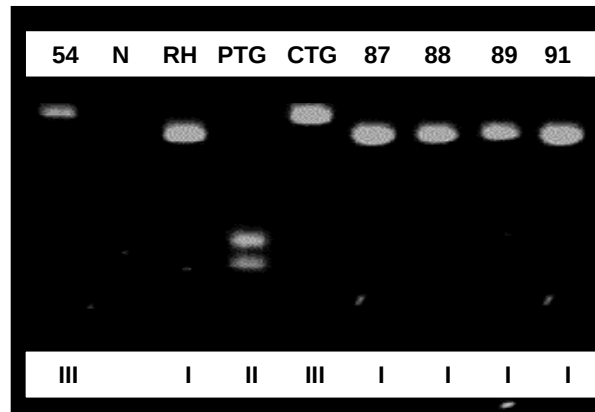


Figura 9 - PCR-RFLP do *locus* c29-2, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com as endonucleases *HpyCH4IV* e *RsaI*. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).

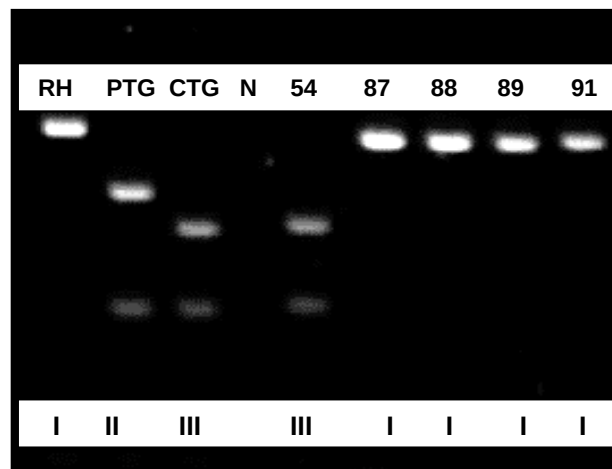


Figura 10 - PCR-RFLP do *locus* L358, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com as endonucleases *HaeIII* e *NlaIII*. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo).

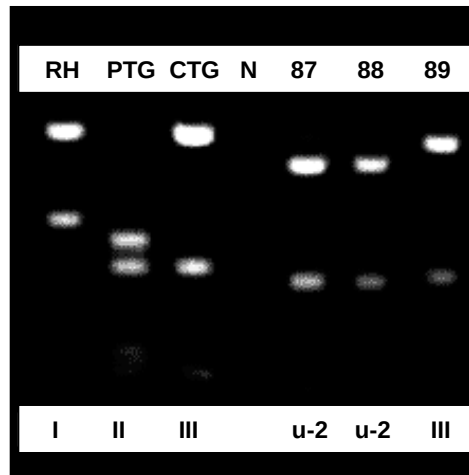


Figura 11 - PCR-RFLP do *locus* PK1, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com as endonucleases *Ava*I e *Rsa*I. Isolados (TgPgBrRs87, 88 e 89), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo), u-2 (alelo diferente dos Tipos clonais I, II e III).

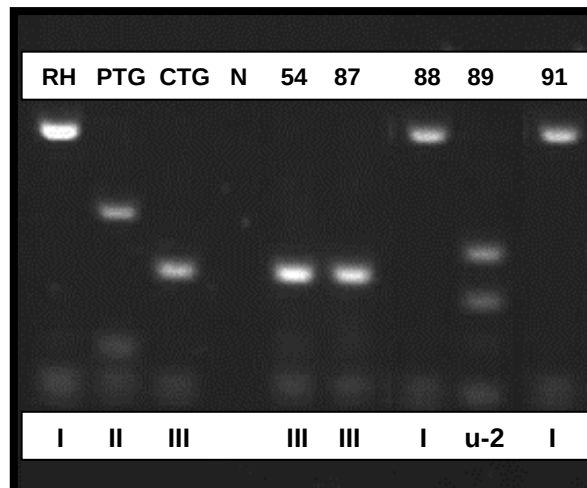


Figura 12 - PCR-RFLP do *locus* CS3, em gel de agarose 2,5%, para a caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* de suínos. Análise de restrição de produtos amplificados com a endonuclease *Nci*I. Isolados (TgPgBrRs54, 87, 88, 89 e 91), cepas de referência RH (genótipo I), PTG (genótipo II) e CTG (genótipo III), N (controle negativo), u-2 (alelo diferente dos Tipos clonais I, II e III).

Anexos

Anexo A – Folha de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 10 de junho de 2011

De: Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Professor (a) Nara Amélia da Rosa Farias

Instituto de Biologia

Senhor(a) Professor(a):

A *CEE A* analisou o projeto intitulado: “**Caracterização Genotípica de Cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de suínos da Região de Pelotas, Sul do Brasil**”, processo nº23110.004632/2011-61, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEE A*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº *CEE A 4632*).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Presidente da CEE A

Anexo B - Informações referentes aos marcadores genéticos, oligonucleotídeos (*primers*) e enzimas de restrição utilizadas na PCR primária, *nested*-PCR e PCR-RFLP

(continua)

	Nº Cromossomo	PCR (<i>Primers</i> externos e internos)	Tamanho (pb)	Enzimas de Restrição	Digestão enzimática e eletroforese	Referências
5' SAG2	VIII	F: GCTACCTCGAACAGGAACAC R: GCATCAACAGTCTCTTCGTTGC F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	241	<i>Mbol</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Howe et al. (1997) Su et al. (2006)
3' SAG2	VIII	F:TCTGTTCTCCGAAGTGAAGTCC R:TCAAAGCGTGCATTATCGC F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	221	<i>HhaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Howe et al. (1997)
alt. SAG2	VIII	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTCGACCAGCGGGAGCAC	546	<i>Hinfl</i> , <i>TaqI</i>	NEB3, BSA, 37°C 30 min, 65°C 30 min 2,5% gel	Lehmann et al. (2000) Su et al. (2006)
BTUB	IX	F: TCCAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAATGACGAAGAA F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGACGC	411	<i>BsiE I</i> , <i>TaqI</i>	NEB4, BSA, 60°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
GRA6	X	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT F:TTTCCGAGCAGGTGACCT R:TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	<i>MseI</i>	NEB2, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Su et al. (2006)
SAG3	XII	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGAACAAGACA F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	311	<i>NciI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Grigg et al. (2001) Su et al. (2006)
Apico	Plastídeo	F: TGGTTTTAACCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCCTTGATA	640	<i>AflIII</i> , <i>DdeI</i>	NEB2, BSA, 37°C 60 min 3% gel	Su et al. (2006)

CS3	VIIa	F: GTGTATCTCCGAGGGGGTCT R: TGTGACTTCTTCGCATCGAC F: AGCGGATTTCCAACACTGTC R: CTGCTGCATTACAAACTCC	557	<i>Mbol</i> , <i>NlaIII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Pena et al. (2008)
c22-8	Ib	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	<i>BsmAI</i> , <i>Mbol</i>	NEB2, BSA, 37°C 30 min 55°C 30 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
c29-2	III	F: ACCCACTGAGCGAAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	<i>HpyCH4IV</i> , <i>RsaI</i>	NEB1, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
L358	V	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTTCTCGAAGACAGC F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	<i>HaeIII</i> , <i>NlaIII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
SAG1	VIII	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	<i>Sau96I</i> <i>HaeII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	GrigG et al. (2001)
PK1	VI	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	<i>AvaI</i> , <i>RsaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)

F: Forward (senso); R: Reward (anti-senso)