

Fernanda Sartori Lima de Godoi

***Toxoplasma gondii*: Diagnóstico da infecção experimental e natural em pombos (*Columba livia*) por técnicas sorológicas, biológicas e moleculares**

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda Sartori Lima de Godoi

***Toxoplasma gondii*: Diagnóstico da infecção experimental e natural em pombos (*Columba livia*) por técnicas sorológicas, biológicas e moleculares**

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Godoi, Fernanda Sartori Lima de.

Toxoplasma gondii: diagnóstico da infecção experimental e natural em pombos (*Columba livia*) por técnicas sorológicas, biológicas e moleculares / Fernanda Sartori Lima de Godoi. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Solange Maria Gennari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Parasitologia.

Versão do título para o inglês: *Toxoplasma gondii*: diagnosis of experimental and natural infection in pigeons (*Columba livia*) by serological, biological and molecular techniques.

Descritores: 1. Oocistos 2. *Toxoplasma gondii* 3. Infecção experimental 4. Pombos 5. Testes sorológicos I. Gennari, Solange Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0217/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Sartori Lima de Godoi.

Título da Dissertação: *Toxoplasma gondii*: diagnóstico da infecção experimental
e natural em pombos (*Columba livia*) por técnicas
sorológicas, biológicas e moleculares.

Orientador(a): Solange Maria Gennari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

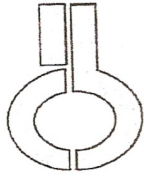
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **042** nas fls. **45** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Solange Maria Gennari** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Isolamento e caracterização biológica e genotípica de toxoplasma gondii parasitando aves do Estado de São Paulo**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Fernanda Sartori Lima de Godoi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA - ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* parasitando aves do Estado de São Paulo", protocolado sob o nº1026/2007, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research "Isolation and biological and genotypical characterization of *toxoplasma gondii* from birds in São Paulo State", protocol number 1026/2007, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 20 de setembro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Aos meus pais, Arlei e Dulce:

Meu porto seguro.

Ao Renê:

*Tudo é possível quando existe amizade,
união e AMOR.*

Ao meu “bem precioso”, Murilo:

*Jamais imaginei que seria capaz de amar e
cuidar de alguém*

INCONDICIONALMENTE....

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela oportunidade, confiança e orientação.

"A satisfação está no esforço feito para alcançar o objetivo, e não em tê-lo alcançado"
(Mahatma Gandhi)

À técnica de nível superior, Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, por dispor de seu tempo para ensinar, com paciência e dedicação, tudo que se refere às técnicas laboratoriais.

À médica veterinária e amiga Dra. Sandra Mayumi Nishi, pelas horas (e dias) que se dispôs a ajudar, sempre bem humorada e com sorriso no rosto, pela confiança, paciência e sincera amizade. Meu sincero agradecimento!

"A principal necessidade de nossas vidas é alguém que nos obrigue a fazer o que podemos fazer. Eis a tarefa do amigo" (Ralph Waldo Emerson)

Ao médico veterinário Fabrício Rassy e ao Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" por permitirem a captura das pombas utilizadas nesse trabalho.

À pós-graduanda Rosely Bianca dos Santos por permitir a captura de pombas em sua propriedade.

Ao técnico do laboratório de Doenças Parasitárias, Sr. Renato Caravieri, pelo grande auxílio nesse trabalho e pela amizade.

Ao Sr. Pedro César Ferreira da Silva, pela imensa ajuda em cuidar, com dedicação, dos animais durante todo o período do trabalho.

À amiga Luciana Mori Viero, pela ajuda, pelos momentos de descontração, fofocas e risadas.... sem esses itens a jornada seria muito mais difícil.

"A penicilina cura os homens, mas é o vinho que os torna felizes" (Alexander Fleming)

Às amigas Luciana Bandini e Patrícia Esmerini, pela colaboração, dicas e apoio.

Aos pós-graduandos, Herbert Sousa Soares e Patrick Mathews, pelo auxílio nas coletas de sangue das pombas.

Às secretárias do VPS (Virgínia, Cristina e Tânia) e ao Danival, por toda ajuda necessária.

Às secretárias do ICB, Angela e Wilma, por estarem sempre dispostas a ajudar, com paciência e educação.

À todos os professores, funcionários, pós-graduandos e estagiários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Parasitologia do ICB que participaram, mesmo que indiretamente, na realização desse trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB/USP e FMVZ/USP, pela atenção e ajuda com as normas bibliográficas.

Ao CNPq (**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**) pela bolsa de mestrado.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados; capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança”

Albert Einstein

RESUMO

GODOI, F. S. L. *Toxoplasma gondii*: Diagnóstico da infecção experimental e natural em pombos (*Columba livia*) por técnicas sorológicas, biológicas e moleculares. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A toxoplasmose é uma zoonose de ocorrência mundial acometendo praticamente todas as espécies homeotérmicas. No ambiente urbano os pequenos roedores e as aves portadoras da infecção crônica seriam as possíveis fontes de cistos de *Toxoplasma gondii* para os gatos, que são os hospedeiros definitivos. O presente estudo teve por objetivo diagnosticar a infecção experimental e natural pelo *T. gondii* em pombos (*Columba livia*) por técnicas sorológicas, biológicas e moleculares. Doze pombos, livres de infecção pelo parasito, foram inoculados com 50 oocistos esporulados de *T. gondii* (amostra VEG) e aos 15, 30, 45 e 60 dias pós infecção (dpi) quatro aves foram sacrificadas e com seus tecidos realizou-se bioensaio em camundongos e *nested*-PCR. Sangue, para a pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii*, foi obtido semanalmente e a presença de anticorpos foi determinada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e técnica de aglutinação modificada (MAT). Dos 12 pombos inoculados sete (58,33%) foram positivos pelas técnicas sorológicas apresentando títulos que variaram de 40 a 5.120 no MAT e de 512 a 4.096 na RIFI. Houve concordância total entre os resultados obtidos pelas técnicas sorológicas e pela *nested*-PCR. No bioensaio em camundongos, dos 12 pombos inoculados, cinco (41,7%) foram positivos ao *T. gondii*. Apenas um pombo veio a óbito, 20 dpi, devido à toxoplasmose. Os pombos de vida livre foram capturados nos municípios de São Paulo, Ibiúna e Sorocaba, estado de São Paulo. Todos os 126 pombos de vida livre foram negativos à pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, testados pelo MAT. Foram realizados bioensaio em camundongos com tecidos de todas as aves capturadas e também, por esta técnica, os pombos mostraram-se negativos, não sendo obtido nenhum isolado de *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Oocistos. Pombos. *Columba livia*. Infecção experimental. Testes sorológicos.

ABSTRACT

GODOI, F. S. L. *Toxoplasma gondii*: **Diagnosis of natural and experimental infection in pigeons (*Columba livia*) by serological, biological and molecular techniques.** 2009. 66 p. Dissertation (Master of Science) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Toxoplasmosis is a zoonotic disease of worldwide occurrence affecting almost all species endothermic. In the urban areas small rodents and birds, with chronic infection, would be the possible sources of cysts of *Toxoplasma gondii* to cats, which are the definitive hosts. This study aimed to diagnose the experimental and natural infection with *T. gondii* in pigeons (*Columba livia*) by serological, biological and molecular techniques. Twelve pigeons, free of infection by the parasite, were inoculated with 50 *T. gondii* sporulated oocysts (VEG strain) and 15, 30, 45 and 60 days post infection (dpi) four birds were sacrificed and their tissues were analyzed by bioassay in mice and *nested*-PCR. Blood was obtained weekly and the presence of *T. gondii* antibodies was determined by indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and modified agglutination test (MAT). Of the 12 pigeons inoculated seven (58.33%) were positive by serological techniques with titers that ranged from 40 to 5.120 in the MAT and 512 to 4.096 in the IFAT. There was total agreement between the results obtained by the serological techniques and by *nested*-PCR. Results of the bioassay in mice showed that from the 12 pigeons inoculated, five (41.7%) were positive to *T. gondii*. Only a pigeon died 20 dpi, due to toxoplasmosis. The free-living pigeons were captured in the cities of São Paulo, Ibiúna and Sorocaba, state of São Paulo. All 126 free-living pigeons were negative for antibodies anti-*T. gondii*, tested by the MAT. Bioassay in mice with tissues from all free-living birds were made and also, by this technique, pigeons proved to be negative, with any *T. gondii* isolate obtained.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Oocysts. Pigeons. *Columba livia*. Experimental infection. Serological Tests.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Ocorrência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> utilizando o teste de aglutinação modificado e o bioensaio em galinhas de vida livre em diferentes regiões do Brasil.....	24
Quadro 2 – Ocorrência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em pombos em diferentes países..	27
Quadro 3 – Isolamento do <i>T. gondii</i> de tecido de pombos naturalmente infectados, em diferentes países, pelo bioensaio em camundongos.....	28
Histograma 1 – Ilustração das etapas do Experimento I.....	32
Quadro 4 – Sequência de bases dos “primers” utilizados nas reações de PCR e <i>Nested-PCR</i> para amplificação de fragmentos do gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	40
Figura 1 – Cisto de <i>Toxoplasma gondii</i> encontrado no cérebro do pombo n° 16, experimentalmente inoculado com 50 oocistos.....	44
Figura 2 – <i>n-PCR</i> , em gel de agarose a 2% de pombos dos diferentes grupos experimentais.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Período de observação em dias pós-infecção (d.p.i.), de cada grupo experimental.....	35
Tabela 2 – Quantidade de camundongos inoculados por pombo, por tipo de tecido para o isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i>	43
Tabela 3 – Quantidade de pombos sorologicamente positivos (MAT e RIFI), por grupo experimental, nos diferente dias de coleta.....	45
Tabela 4 – Número de camundongos infectados no bioensaio com tecidos de pombos inoculados experimentalmente com <i>T. gondii</i>	46
Tabela 5 – Número de amostras positivas (examinadas) pela <i>Nested</i> -PCR dos pombos dos diferentes grupos experimentais.....	47
Tabela 6 – Comparação das diferentes técnicas utilizadas (MAT, RIFI, Bioensaio em Camundongos e <i>nested</i> -PCR) para a detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em pombos experimentalmente infectados, utilizando material biológico do dia da eutanásia.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
°C	grau Celsius
µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µM	micromolar
µm	micromilímetro
dATP	2`-deoxiadenosina 5`-trifosfato
dCTP	2`-deoxicitocina 5`-trifosfato
dGTP	2`-deoxiguanosina 5`-trifosfato
dTTP	2`-deoxitimidina 5`-trifosfato
d.p.i.	dias pós inoculação
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	e colaboradores
g	grama(s)
<i>g</i>	aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
h	hora
H ₃ BO ₃	ácido bórico
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma(s)
km	quilômetro (s)
M	molar
MAT	teste de aglutinação modificado
mg	miligrama(s)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)

N	normal
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio monobásico anidro
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
NaN ₃	azida sódica
<i>n</i> -PCR	<i>Nested</i> -PCR
PB	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
p.i.	pós inoculação
pmol	picomol(s)
q.s.p.	quantidade suficiente para
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
™	“trade mark”
Tris	hidroximetilaminometano
U	unidade internacional
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS.....	31
3.2 EXPERIEMNTO I: “Infecção experimental de pombos (<i>Columba livia</i>) com oocistos esporulados de <i>Toxoplasma gondii</i> ”.....	31
3.2.1 Animais experimentais.....	33
3.2.2 Colheita de sangue.....	33
3.2.3 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	33
3.2.3.1 Teste de Aglutinação Modificado (MAT).....	33
3.2.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	34
3.2.4 Infecção experimental e delineamento.....	35
3.2.5 Isolamento de <i>T. gondii</i> em camundongos.....	36
3.2.5.1 Digestão péptica de tecidos.....	36
3.2.6 Bioensaio em camundongos.....	37
3.2.7 Pesquisa de <i>T. gondii</i>	37
3.2.8 Análise Molecular de <i>T. gondii</i>	38
3.2.8.1 Extração e purificação do DNA.....	38
3.2.8.2 PCR e <i>Nested-PCR</i>	39
3.2.8.3 Análise do produto amplificado.....	41
3.3 EXPERIMENTO II: “Ocorrência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em pombos (<i>Columba livia</i>) de vida livre”.....	42
3.3.1 Animais experimentais.....	42
3.3.2 Colheita de sangue.....	42
4 RESULTADOS.....	44
4.1 EXPERIMENTO I.....	44
4.1.1 Infecção experimental.....	44
4.1.2 Sorologia dos pombos.....	45
4.1.3 Bioensaio em camundongos e isolamento de <i>T. gondii</i>	45
4.1.4 Análise molecular dos tecidos.....	47

4.1.4.1 <i>n</i>-PCR dos pombos.....	47
4.1.5 Comparação entre as técnicas utilizadas.....	48
4.2 EXPERIMENTO II.....	50
4.2.1 Sorologia dos pombos.....	50
4.2.2 Bioensaio em camundongos e isolamento do <i>T. gondii</i>.....	50
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Toxoplasma gondii foi primeiramente descrito por Splendore (1908) em coelhos de laboratório, no Brasil, em São Paulo, como *Leishmania* e, concomitantemente, por Nicolle e Manceaux (1908) que descreveram taquizoítos do mesmo agente nos tecidos de *Ctenodactylus gundi*, um roedor africano, utilizado como animal de laboratório, no Instituto Pasteur da Tunísia. Este foi incluído no gênero *Leishmania*, como *Leishmania gondii* e no ano seguinte, Nicolle e Manceaux (1909) descreveram e denominaram o gênero *Toxoplasma*. O nome deriva do grego no qual *toxon* = arco e *plasma* = forma, referindo-se ao formato em lua crescente do taquizoíto (DUBEY e BEATTIE, 1988; DUBEY, 1998; FORTES, 1993).

O parasito pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidii, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae e Sub-família Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* (LEVINE et al., 1980), com somente uma espécie válida: *Toxoplasma gondii* (DUBEY e BEATTIE, 1988; SIBLEY e BOOTHROYD, 1992; TENTER e JOHNSON, 1997).

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pelo *T. gondii*, um parasito coccídeo intracelular obrigatório, que infecta a maioria dos animais homeotérmicos incluindo as aves, os animais domésticos e silvestres e o homem (DUBEY e BEATTIE, 1988; REMINGTON et al., 1995). Kalyakin 1971, apud SOUSA, 2004 constatou que 226 espécies de mamíferos e 110 de aves (totalizando 336 espécies) já foram identificadas mundialmente como infectadas pelo *T. gondii*.

A toxoplasmose é de grande importância em saúde pública e, em condições normais, a infecção é crônica e leva à formação de cistos que podem se manter latentes por longos períodos. Embora assintomática na maioria dos indivíduos, a primo-infecção em gestantes pode fazer com que o parasito atinja o feto e provoque lesões neurológicas severas no recém nascido ou induza abortamentos, principalmente nas fases iniciais da gestação. Em indivíduos imunossuprimidos pode causar reativação de infecções latentes, levando a quadros clínicos severos e às vezes fatais; nos animais de produção pode acarretar grandes perdas econômicas (DUBEY e BEATTIE, 1988; LÜDER e GROSS, 1998; TENTER et al., 2000).

Nos anos 70, completou-se o conhecimento do ciclo biológico desse parasito através da descoberta dos estágios sexuais no intestino delgado dos gatos (FRENKEL et al., 1970). O ciclo é heteroxeno facultativo. A fase sexuada de desenvolvimento ocorre no intestino delgado dos felídeos (silvestres e gatos domésticos), hospedeiros definitivos do agente,

resultando na formação de oocistos que são eliminados juntamente com as fezes contaminando o ambiente (DUBEY e BEATTIE, 1988, LINDSAY et al., 1997) porém, nesses animais, pode ocorrer, paralela ou simultaneamente, a multiplicação extra intestinal assexuada (taquizoítos e bradizoítos). Sendo assim, os felídeos também podem servir de hospedeiros intermediários (LINDSAY et al., 1997), nos quais ocorre unicamente a multiplicação assexuada (DUBEY, 1994).

Há três estágios infectantes, os taquizoítos livres ou em pseudocistos em diversos órgãos, os bradizoítos nos cistos teciduais e os esporozoítos nos oocistos esporulados. Os três estágios são infectantes para os hospedeiros intermediários e definitivos (DUBEY e BEATTIE, 1988).

Após a ingestão pelo hospedeiro definitivo, a parede externa de cistos e oocistos é rompida por degradação enzimática e as formas infectantes (bradizoítos e esporozoítos) são liberadas no lume intestinal. No intestino, elas rapidamente invadem as células e se diferenciam em taquizoítos, que se multiplicam rapidamente e se dividem assexuadamente por endodiogenia e podem estar presentes em qualquer célula ou tecido e líquidos intersticiais. Os taquizoítos caracterizam a fase aguda da infecção (DUBEY et al., 1970a) e representam um problema em saúde pública, pois são as formas transmitidas verticalmente na gestação.

Os cistos teciduais que ocorrem na fase crônica da doença são um acúmulo de *T. gondii* sob a forma de bradizoítos, estágios que se multiplicam lentamente, também por endodiogenia, e são envolvidos por uma parede cística. Esses cistos se formam com o início da resposta imune do hospedeiro, sendo uma forma de proteção do parasito. São encontrados principalmente no cérebro, musculaturas cardíaca e esquelética e retina, pois nesses locais, o acesso de anticorpos é restrito a um pequeno número de células. Além desses locais, os cistos podem ser encontrados em outros órgãos e tecidos do hospedeiro, como fígado, pulmões e rins, persistindo por um longo período, provavelmente por toda a vida do hospedeiro (DUBEY et al., 1970b; DUBEY e FRENKEL, 1976; DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000). Apesar de predominarem na fase crônica, os cistos são formados no início da infecção; em camundongos observou-se a formação de cistos oito dias pós-infecção, independentemente do estágio infectante e via de inoculação (DUBEY et al., 1997; DUBEY e FRENKEL, 1998).

Experimentos mostram que a localização e o número de cistos nos animais diferem dependendo do hospedeiro e da amostra de *T. gondii*. Em camundongos e ratos foram encontrados mais cistos no cérebro do que em tecidos viscerais, independentemente da

amostra administrada. Entretanto, em mamíferos de grande porte, o maior número de isolamentos do parasito em provas biológicas tem sido observado em tecidos musculares (DUBEY, 1997a; DUBEY, 1998; DUBEY e FRENKEL, 1998).

Para a detecção de cistos teciduais nos órgãos dos hospedeiros, o método de digestão de tecidos seguido de bioensaio em camundongos pode ser utilizado afim de aumentar a taxa de recuperação do parasito (DUBEY, 1998; DUBEY et al.; 1995a). O bioensaio em camundongos é importante, pois o número de cistos em animais de grande porte é baixo, ao redor de um cisto para 25-250 g de órgão. A digestão dos tecidos de um hospedeiro em tripsina ou pepsina permite o exame de maior quantidade de material, levando a dissolução da parede dos cistos, liberando os bradizoítos. Um cisto de *T. gondii* contém quatro a centenas de bradizoítos, dependendo da amostra, hospedeiro e tempo de infecção (DUBEY, 1997b; DUBEY et al. 1997; DUBEY e BEATTIE, 1988).

Alguns autores (BIANCIFIORI et al., 1986; PEIXOTO E LOPES, 1995) usaram o bioensaio em camundongos sem a digestão dos tecidos, apenas homogeizando os órgãos em solução salina contendo penicilina e estreptomicina, também conseguindo isolar o parasito nas espécies estudadas, pombos e galinhas, respectivamente.

As principais formas de transmissão da infecção são a transplacentária, a ingestão de oocistos esporulados, provenientes de fezes dos gatos, contaminando alimentos e água ou de tecidos animais contendo cistos infectantes. A mais importante via de infecção nos gatos é pelo consumo de carne crua fornecida pelo proprietário ou devido a hábitos de caça dessa espécie. Segundo alguns autores, no ambiente urbano os pequenos roedores e as aves, portadores da infecção crônica, seriam as possíveis fontes de cistos de *T. gondii* para os gatos domésticos (DUBEY e FRENKEL, 1998) por viverem próximos às residências facilitando o estabelecimento da relação presa-predador (RUIZ e FRENKEL, 1980). Atualmente não existem métodos que determinem se um hospedeiro se infectou pela ingestão de cistos ou oocistos esporulados (DUBEY, 1994; DUBEY, 2001; BOOTHROYD e GRIGG, 2002).

Pouco se sabe sobre a importância da transmissão horizontal do *T. gondii* entre diferentes espécies de hospedeiros, a importância dos reservatórios do parasito na natureza e do impacto epidemiológico de diferentes espécies causando infecção ou doença em seres humanos (TENTER et al., 2000).

A infecção na população humana, avaliada por métodos sorológicos, atinge de 30 a 70%, dependendo da população amostrada e técnica utilizada (DUBEY e BEATTIE, 1988). Segundo Tenter et al. (2000) em vários países da América Latina, incluindo o Brasil, a soroprevalência de infecção por *T. gondii* é alta e está entre 51 a 72%. Em algumas regiões do

Brasil, anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em 60% de crianças entre seis e oito anos de idade, o que foi associado à ingestão de oocistos refletindo um ambiente altamente contaminado (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2001).

Nos centros urbanos a infecção pelo *T. gondii* está associada a fatores sócio-culturais e hábitos alimentares da população, entretanto a manutenção do parasito na natureza envolve diversas espécies animais que agem como hospedeiros intermediários do agente.

Rotineiramente o diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* é firmado por meio de testes sorológicos para a detecção de anticorpos específicos. São vários os testes disponíveis, sendo que na medicina veterinária a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste de aglutinação modificado (MAT) são testes amplamente utilizados.

Quando é possível a obtenção de fragmentos de tecidos para a pesquisa do parasito, são realizados os ensaios biológicos em camundongos que fornecem informações quanto às características biológicas da amostra de *T. gondii*. O ensaio biológico de amostras de tecidos em camundongos é a prova de eleição para a detecção e isolamento do parasito. Os órgãos mais frequentemente utilizados são o coração, o pulmão, o baço e o cérebro. As amostras virulentas de *T. gondii* são letais aos camundongos, induzem infecção aguda sendo possível identificar grande quantidade de taquizoítos nos pulmões e cérebro nos primeiros dias pós-infecção, quando parte desses animais vêm à óbito. As amostras avirulentas produzem infecção crônica, sendo observados cistos no cérebro e produção de anticorpos específicos (DUBEY e BEATTIE, 1988).

A patogenicidade do *T. gondii* está estreitamente relacionada à virulência da amostra e à espécie hospedeira. O camundongo (*Mus musculus*) tem sido utilizado preferencialmente como modelo animal experimental da toxoplasmose. As amostras de *T. gondii* variam em sua patogenicidade para os camundongos, sendo altamente virulentas, ou não virulentas, originando infecções crônicas. Essas diferenças podem ser particularmente percebidas no primeiro isolamento, uma vez que a patogenicidade pode ser alterada por passagens repetidas no mesmo hospedeiro. A virulência em camundongos é normalmente determinada pela morbidade e mortalidade causada pelas amostras (KAUFMAN et al., 1958; KAUFMAN et al., 1959; DUBEY e BEATTIE, 1988; SAEIJ et al., 2005).

Nos primeiros estudos de genotipagem de *T. gondii*, foi observado que mesmo diferindo em algumas propriedades biológicas, as amostras conhecidas foram similares antigenicamente, morfológicamente e na sua capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992). Apesar de sua distribuição cosmopolita, *T. gondii* apresentou baixa variação genética quando diferentes isolados foram analisados

através do polimorfismo do comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição – RFLP (CRISTINA et al., 1991; SIBLEY e BOOTHROYD, 1992) ou marcadores isoenzimáticos (DARDÉ et al., 1992) revelando, nessas amostras, uma estrutura populacional altamente clonal (HOWE e SIBLEY, 1995). Modelos de evolução clonal na população são constituídos por organismos que geram progênie idêntica ou quase idêntica, de forma que os genótipos se propagam pelas gerações e são estáveis por longos períodos, sendo que as modificações genotípicas são mínimas (SOARES, 2004).

Toxoplasma gondii isolados de humanos e de animais da Europa e América do Norte foram classificados em três linhagens genéticas - Tipo I, II e III (DARDÉ et al., 1992; HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002). Entretanto, recentes estudos em isolados de animais ou humanos em regiões da América Central e do Sul, em especial, revelaram grande variabilidade genética, diferindo do que havia sido anteriormente observado (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004), mostrando que isolados de *T. gondii* do Brasil são geneticamente diferentes daqueles da América do Norte e da Europa (LEHMANN et al., 2004, 2006; FERREIRA et al., 2006; KHAN et al., 2005, 2006; SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007a,b).

Pena et al. (2008) genotiparam 46 isolados de gatos do estado de São Paulo, Brasil, pela PRC-RFLP multilocus e compararam com os isolados brasileiros de origem animal também analisados pela mesma metodologia. Descreveram quatro linhagens mais comuns no Brasil, denominadas Tipo Br I, Br II, Br III e Br IV, concluindo que a população de *T. gondii* no Brasil é bastante diversificada com poucas linhagens clonais estabelecidas nas diferentes áreas geográficas do país já estudadas.

Na literatura são encontradas poucas publicações avaliando a ocorrência de *T. gondii* em espécies animais que são presas de gatos. Na Costa Rica, o isolamento de *T. gondii* foi de 3,5% em 202 camundongos (*Mus musculus*), 12,5% em 120 ratos (*Rattus norvegicus*), 16% em 106 pardais (*Zonotrichia capensis*) e 54% em 50 galinhas (*Gallus domesticus*). Não foram isolados *T. gondii* de moscas domésticas ou baratas capturadas na natureza, mas foram encontrados em quatro de 16 lotes de minhocas, podendo ser estas possíveis fontes de infecção de *T. gondii* para as aves (RUIZ e FRENKEL, 1980).

Em cinco anos de estudo prospectivo na cidade do Panamá foram detectados anticorpos específicos anti-*T. gondii* em 45,6% de 110 gatos, 23,3% de 226 *Rattus norvegicus*, 0,035% de 571 *Mus musculus* e 13,4% de 216 pássaros (FRENKEL et al., 1995). Muradian (2009) detectou uma baixa taxa de infecção em roedores sinantrópicos capturados em São Paulo, com 0,46 % dos 217 roedores pesquisados, positivos a anticorpos anti-*T.*

gondii. Este fato indica que outras espécies animais sinantrópicas possam abrigar os cistos de *T. gondii* e agir como possíveis fontes de infecção para os gatos domésticos, dentre essas espécies, encontram-se as aves.

Há poucas referências sobre toxoplasmose em aves no Brasil (SICK, 1997). A grande maioria das publicações recentes sobre esta doença em aves refere-se a infecções em galinhas. Nos trabalhos em que são realizados ensaios biológicos e caracterização genotípica das amostras, destacam-se os resultados obtidos em levantamentos realizados com galinhas criadas em vida livre por servirem como um bom indicador de contaminação ambiental (DUBEY et al. 2004, 2005a,b,c 2006b). No Brasil, estudos recentes com galinhas de vida livre, utilizando MAT como técnica sorológica, encontraram valores de ocorrência que variaram de 39% (DUBEY et al., 2002) a 66% (DUBEY et al., 2006a). O Quadro 1 apresenta os valores de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* encontrados em estudos brasileiros com galinhas “caipiras”.

Quadro 1 - Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* utilizando o teste de aglutinação modificado e o bioensaio em galinhas de vida livre em diferentes regiões do Brasil.

Região brasileira	Nº de examinados	MAT positivo (%)	Ponto de corte	Bioensaio positivo (%)	Referência
São Paulo	82	39,0	1:10	75,0	Dubey et al. (2002)
Rio de Janeiro	198	65,15	1:10	82,6	Silva et al. (2003)
Paraná	40	40,0	1:5	81,0	Dubey et al. (2003b)
Amazônia	50	66,0	1:5	72,7	Dubey et al. (2006a)
Pará e Sul do Rio Grande do Sul	84	46,4	1:10	84,6	Dubey et al. (2007b)
Nordeste	152	53,3	1:5	28,4	de Oliveira (2009)

Os métodos de diagnóstico sorológico apresentam baixa capacidade de diagnóstico da infecção em aves, sendo frequente o isolamento do agente em indivíduos sorologicamente negativos, como demonstraram Dubey et al. (2002, 2003a,b, 2005a, 2007b). Estes autores observaram que gatos alimentados com tecidos de galinhas soronegativas (MAT <5) eliminaram oocistos de *T. gondii* ao redor de sete dias pós-infecção. Acredita-se que a verdadeira porcentagem de infecção por *T. gondii* em aves pode ser maior que os valores indicados nos inquéritos sorológicos apresentados na literatura (FRENKEL, 1981; DUBEY, 2002).

As aves de vida livre com capacidade de vôo, e deste modo com capacidade de exploração de uma área mais ampla, apresentam um maior risco de exposição à infecção e são um bom indicador de contaminação ambiental. A descrição da ocorrência da infecção e isolamento de *T. gondii* em aves sinantrópicas também é bastante escassa (KIRKPATRICK et al., 1990; LINDSAY e BLAGBURN, 1999; DUBEY, 2002).

Não existem muitos trabalhos com relação à patogênese, sorologia e epidemiologia da toxoplasmose entre os pombos para avaliar a sua participação e importância no tangente à saúde pública. O pombo, que é principalmente um pássaro de vôo livre, pode representar um reservatório na propagação da doença e ser uma fonte de infecção para os predadores, bem como para o homem (BIANCIFIORI et al., 1986).

Em virtude de o *Toxoplasma* ter sido encontrado em diversas espécies de aves, nos trabalhos mais antigos, descrição de parasitos *Toxoplasma-like* recebem diferentes denominações, entretanto Levine (1977) as juntou todas numa única espécie.

Em pombos a primeira descrição de infecção por *T. gondii* foi feita em São Paulo, Brasil, em 1911 por Carini apud DUBEY, 2002, examinando fígado e baço de um pombo. Dois anos mais tarde Carini e Maciel apud DUBEY, 2002, infectaram pombos com tecidos de cães que haviam morrido de toxoplasmose, concluindo que a doença das aves era a mesma dos mamíferos. No mesmo ano Mello observou o parasita em pombos e surtos de toxoplasmose aguda, nesta espécie, foram encontrados em diferentes partes do mundo, descritos em 1942 por Springer no Brasil, por Johnson (1943 apud SIMITCH et al., 1965) no Panamá e por Wiktor (1950 apud SIMITCH et al., 1965), no Congo. Ainda nas décadas de 30 e 40, Reis e Nóbrega (1936, apud DUBEY, 2002) e Nóbrega e Reis (1942 apud DUBEY, 2002), em São Paulo, Brasil, isolaram *T. gondii* de pombos e conseguiram transferi-lo a outros animais após manter a cepa em sucessivas passagens em pombos.

Jacobs et al. (1952), em estudos com toxoplasmose em pombos, sugeriram, numa época em que o ciclo do parasito ainda era desconhecido, que o pombo pudesse ter

importância na epidemiologia da doença, como também sugeriram uma possível participação de artrópodes no ciclo biológico do *T. gondii*.

Os relatos de toxoplasmose aguda acometendo diversas espécies de aves referem-se principalmente a surtos em criações e em aves mantidas em cativeiro. Estes surtos caracterizam-se por elevada morbidade, evolução rápida com a presença de sintomas neurológicos, dispnéia, cegueira uni ou bilateral e alta mortalidade (DUBEY et al., 2001; DUBEY, 2002; WORK et al. 2002; MAROBIN et al., 2004; SZABO et al., 2004).

Em pombos foram descritos febre, anorexia, emaciação, conjuntivite com presença do parasito no exsudato ocular e convulsões momentos antes da morte. *T. gondii* foi encontrado disseminado em vários órgãos, especialmente fígado e pulmões (DUBEY, 2002). Pombos infectados experimentalmente com diferentes doses de oocistos esporulados de *T. gondii* (amostra RH) apresentaram diarreia, tremores, incoordenação e morte (BIANCIFIORI et al., 1986), sendo que somente aqueles que receberam a menor dose (50 oocistos) sobreviveram à infecção. Encefalite e neurite foram encontrados em pombos que se recuperaram da doença (JOHNSON, 1943 apud DUBEY, 2002).

Há poucos relatos de infecção experimental em pombos, sendo estudos bastante antigos. Em 1965, Simitch e colaboradores infectaram experimentalmente 30 pombos, 15 com cistos (os pombos ingeriram músculos de ratos que continham cistos) e 15 foram alimentados com tecidos de camundongos previamente infectados com oocistos de *T. gondii*. Somente um camundongo apresentou cistos de *T. gondii*, indicando baixa infecção por esta via.

Mineo et al. (2009) infectaram quatro pombos com 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* da amostra RH. Os pombos apresentaram altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* pela RIFI com picos entre 10 e 15 dias, com acentuada diminuição, apesar de serem detectados até o final do período experimental de 45 dias. Um pombo morreu de toxoplasmose aguda.

Poucos estudos de soroprevalência de *T. gondii* foram publicados utilizando os pombos de vida livre. No Brasil não há relatos dessas publicações. Kirkpatrick et al. (1990), em New Jersey, USA, através do MAT (≥ 40) constataram que duas (5,9%) de 34 aves examinadas eram soropositivas para anticorpos anti-*T. gondii*, apresentando altos títulos (320). Mushi et al. (2001), na África do Sul, obtiveram 100% (16/16) de soros positivos de pombos testados pelo teste de hemaglutinação indireta (IHAT), na diluição de 1:64. Tsai et al. (2006), através do teste de aglutinação em látex (LAT ≥ 32), observaram 31 (4,7%) de 665 pombos examinados soropositivos a *T. gondii* em Taiwan, China.

Recentemente foram testados 695 soros de pombos capturados na cidade de Lisboa, Portugal, para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* pelo Teste de Aglutinação Direto (DAT ≥ 20), resultando em apenas 23 (4,6%) aves positivas (WAAP et al., 2008). Salant et al. (2009) examinaram 495 soros de pombos capturados em diferentes localidades geográficas de Israel pelo MAT e também encontraram baixa ocorrência, com 20 (4,04%) animais positivos.

O quadro 2 apresenta outros resultados de sorologia para *T. gondii* em pombos de diferentes países e o quadro 3 o resultado de isolamento pelo bioensaio em camundongos com tecidos dessa espécie animal.

Quadro 2 – Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em pombos em diferentes países.

País	Nº examinado	Positivos (%)	Teste sorológico	Ponto de corte	Referência
EUA	20	10,0	DT	1:16	Feldman e Sabin (1949)
EUA	80	8,7	DT	1:16	Jacobs et al. (1952)
EUA	15	6,0	DT	1:16	Gibson e Eyles (1957)
Alemanha	49	2,0	DT	1:16	Niederehe (1964)
Itália	108	3,0	DT	1:50	Mandelli e Persiani (1966)
EUA	322	8,6	IHAT	1:16	Pendergraph (1972)
Bélgica	220	3,18	MAT	1:64	Cotteleer e Famerée (1978)
EUA	34	5,9	MAT	1:40	Kirkpatrick et al. (1990)
África Sul	16	100	IHAT	1:64	Mushi et al. (2001)
Taiwan	665	4,7	LAT	1:32	Tsai et al. (2006)
Portugal	695	4,6	DAT	1:20	WAAP et al. (2008)
Israel	495	4,0	MAT	1:5	Salant et al. (2009)

DT: dye test (teste do corante); IHAT: teste de hemaglutinação indireta; MAT: teste de aglutinação modificado; LAT: Teste de aglutinação em látex; DAT: Teste de aglutinação direto

* Adaptado de Dubey et al. (2002)

Quadro 3 – Isolamento do *T. gondii* de tecido de pombos naturalmente infectados, em diferentes países, pelo bioensaio em camundongos.

País	Nº de amostras	Infectados (%)	Referência
EUA	1	100	Feldman e Sabin (1949)
EUA	50	2,0	Manwell e Drobeck (1951)
EUA	80	5,0	Jacobs et al. (1952)
EUA	16	6,0	Gibson e Eyles (1957)
Dinamarca	3	100	Siim et al. (1963)
Eslováquia	16	12,5	Catár (1974)
República Checa	606	1,0	Literák et al. (1992)

* Adaptado de Dubey et al. (2002)

Dubey et al. (1993a,b, 1994a,b, 1995) examinaram soros de aves de diferentes espécies por diferentes técnicas sorológicas, MAT – Teste de Aglutinação Modificado; LAT – Teste de Aglutinação em Latex; DT – Dye Test; ELISA – Teste Imunoenzimático; RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta e IHAT – Teste de Hemaglutinação Indireta. As aves eram amostradas antes e após terem sido infectadas por oocistos de *T. gondii*. Observaram que anticorpos anti-*T. gondii* não foram detectados pelo DT em nenhuma das espécies de pássaros utilizadas. IHAT e LAT foram inferiores ao MAT, o qual detectou mais precocemente os anticorpos e com mais altos títulos. ELISA mostrou-se eficaz na detecção de anticorpos de perus e galinhas, não tendo sido testado em outras aves e RIFI também mostrou bons resultados em soros de aves galináceas.

Os pombos domésticos pertencem ao filo Chordata, classe Aves, ordem Columbiformes, família *Columbidae*, gênero *Columba* e espécie *Columba livia* (Gmelin, 1789) foram criados há mais de 5000 anos pelos asiáticos e são descendentes do pombo-bravo do Mediterrâneo europeu.

No Brasil, o pombo foi introduzido já no século XVI como ave doméstica, continuou como tal tornando-se, entretanto, parcialmente selvagem, arisco e independente de cuidados humanos (SICK, 1997).

A distribuição original desta espécie é difícil de determinar pela sua longa história de domesticação. Atualmente a espécie apresenta uma distribuição vasta que incluem todos os continentes com exceção da Antártida (GIBBS et al., 2001).

Os pombos são bastante comuns em áreas urbanas, segundo o Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais (2006), e constroem seus ninhos em locais altos como telhados e terraços de edifícios, torres de igrejas, forros de casas habitadas ou abandonadas e beirais de janelas, sempre protegidos da chuva e ventos fortes. Essas aves se proliferam sem controle nos centros urbanos, onde se adaptam muito bem e por esses motivos adquiriram o status de praga urbana (Federação Columbófila Brasileira, 2008).

Os pombos alimentam-se geralmente de sementes, grãos e frutas, descendo ao solo para comer; com um rápido movimento de bico viram as folhas mortas para descobrir sementes e frutos caídos. Ingerem os grãos inteiros, sem quebrá-los enchendo o papo, onde se dá a digestão (SICK, 1997). Eventualmente se alimentam de pequenos insetos e vermes e nas grandes cidades, do que estiver disponível nas ruas, incluindo arroz cru ou cozido, pão, ração animal, restos de alimentos e lixo (PADORI, 2009). Segundo a Ambiente Brasil (2009), a alimentação ativa em parques e praças acarreta considerável aumento da população dessas aves. A quantidade de alimento ingerida varia de 30 a 40 g por dia (FONSECA, 2000).

Uma característica única dos pombos é o modo como bebem água, submergem a cabeça dentro da água até os olhos, ingerindo-a com movimentos da língua, processo mais rápido e eficiente (SICK, 1997). Chegam a ingerir de 30 a 60 mL de água por dia (em média 45 mL) e durante o verão esse valor pode chegar a 100 mL ao dia (FONSECA, 2000).

Os pombos são excelentes voadores, podendo voar a velocidades como 40 a 50 km/h e percorrer até 800 km por dia, porém permanecem, usualmente, nas proximidades do seu território natal. É curiosa a sua capacidade de orientação, regressando e encontrando seu lugar de origem (SICK, 1997). O período de vida dessas aves, nos centros urbanos, é de três a cinco anos, mas em condições silvestres pode chegar a quinze anos (AMBIENTE BRASIL, 2009).

2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo:

Diagnosticar a infecção experimental e natural pelo *Toxoplasma gondii* em pombos por técnicas sorológicas, biológicas e moleculares.

Para tanto se realizou:

- Infecção experimental em pombos com oocistos esporulados de *T. gondii* e avaliação das técnicas sorológicas (reação de imunofluorescência indireta e aglutinação modificada) para o diagnóstico da infecção;
- Bioensaio em camundongos e *Nested-PCR* dos tecidos dos pombos e dos camundongos experimentalmente infectados para diagnóstico da infecção; e
- Pesquisa de anticorpos e bioensaio em camundongos em pombos de vida livre capturados nos municípios de São Paulo, Ibiúna e Sorocaba.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Segundo o Núcleo de Fauna e Recursos Pesqueiros do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) não há necessidade de autorização para a captura de animais considerados domésticos (Portaria IBAMA nº 93 de 1998), tais como os pombos, animais utilizados neste experimento.

O estudo consta de dois experimentos que para melhor compreensão serão apresentados separadamente, sendo:

- Experimento I – Infecção experimental de pombos (*Columba livia*) com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii*;
- Experimento II – Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em pombos (*Columba livia*) de vida livre.

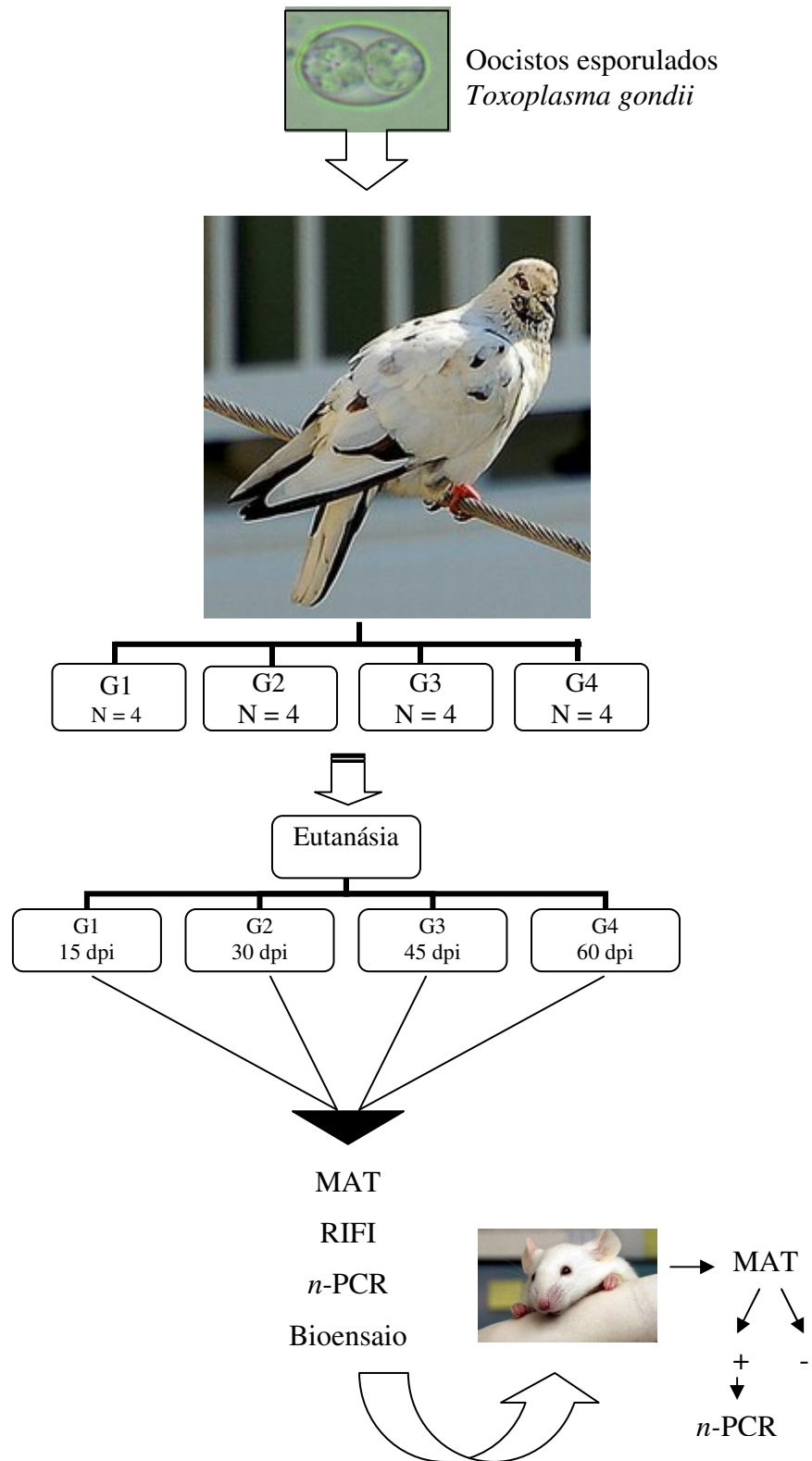
Foi realizado contato com o médico veterinário responsável pelo Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” no município de Sorocaba/SP, com proprietários rurais do município de Ibiúna/SP e com moradores da região urbana do município de São Paulo/SP, locais de procedência das aves utilizadas nos Experimentos I e II, que colaboraram na captura desses animais.

3.1 LOCAIS DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 EXPERIMENTO I: “**Infecção Experimental de pombos (*Columba livia*) com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii***”

O histograma 1 ilustra as diferentes etapas do Experimento.



N = nº de pombos por grupo; d.p.i. = dias pós inoculação; MAT = Teste de Aglutinação Modificado; RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta; *n*-PCR = *nested*-PCR.

Histograma 1 – Ilustração das etapas do Experimento I.

3.2.1 Animais experimentais

Foram capturados dezesseis pombos jovens, com aproximadamente 90 dias, de vida livre, em fevereiro de 2009, sendo doze capturados em Ibiúna/SP e quatro em São Paulo/SP. As capturas, em Ibiúna, foram feitas com armadilhas de forma individual e em São Paulo, os pombos foram capturados em arapucas pequenas, com capacidade para, no máximo, dois pombos.

3.2.2 Colheita de sangue

Semanalmente, desde a seleção das aves até a eutanásia, foi coletado sangue (aproximadamente 1,0 mL) pela veia braquial de cada um dos pombos. Esse sangue foi centrifugado a 600 g por 10 minutos para obtenção do soro para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*. Todas as aves eram negativas no dia da infecção.

3.2.3 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*

3.2.3.1 Teste de Aglutinação Modificado (MAT)

Os soros dos pombos do experimento I e II foram testados para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT) segundo Dubey e Desmonts (1987), nas diluições de 1:5, 1:50 e 1:500 e quando positivos, foi determinado o título final da reação.

As amostras foram diluídas em microplaca (96 poços) em solução salina tamponada (NaCl 0,146 M; NaH₂PO₄ 0,0026 M; Na₂HPO₄ 0,008 M), pH 7,2 e filtrada em membrana de policarbonato com 0,45 µm de porosidade. Em seguida, 120 µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5 mL de solução alcalina tamponada (NaCl 0,12 M; H₃BO₃ 0,05 M; NaN₃ 0,03 M; albumina sérica bovina para uma

solução de uso a 0,4%), pH 8,95; 35 µL de mercaptoetanol 0,2 M e 50 µL de Azul de Evan 0,2%. Esta mistura foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25 µL de reagentes por poço. Os soros diluídos eram transferidos para essa microplaca e misturados ao antígeno (v/v). A placa era selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada por 12 hs em estufa a 37 °C.

A visualização de um botão de contorno definido na base do poço da placa era anotada como resultado negativo; enquanto que a formação de um carpete completo, ou um véu de contorno pouco definido era anotado como positivo.

Em todas as reações foram usados controles positivo e negativo, previamente conhecidos e controle do antígeno. O antígeno foi fornecido gentilmente pelo Dr. J. P. Dubey do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland.

3.2.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros dos pombos do experimento I também foram testados para presença de anticorpos anti-*T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) segundo Camargo (1964), na diluição de 1:4 e para os soros positivos foi determinada a titulação final. As amostras foram diluídas em microplacas (96 poços) em uma solução de PBS (NaCl 0,731 M; KCl 0,027 M; NaH₂PO₄ 0,105 M; KH₂PO₄ 0,018 M), pH 7,2; 20 µL foram colocados em lâminas contendo o antígeno específico fixado (taquizoítos de *T. gondii*). Estas foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos, em câmara úmida. Após três lavagens por 10 minutos com PBS, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e adicionou-se conjugado anti-pássaro (*Goat anti-Bird IgG-h+I, FITC Conjugated, 1,0 mg/mL, Bethyl Laboratories, Inc., USA.*) previamente diluído a 1:300 em solução de PBS contendo Azul de Evan 0,01%. O processo de incubação e lavagens foi repetido. Soros controle, positivo e negativo, foram adicionados em todas as lâminas. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX60-FLA, EUA) e foram consideradas positivas as amostras apresentando fluorescência em toda a superfície do taquizoíto. Fluorescência apical ou parcial foi considerada negativa.

3.2.4 Infecção experimental e delineamento

Para a infecção experimental dos pombos foram utilizados oocistos esporulados de *T. gondii* da amostra VEG, gentilmente cedidos pelo Prof. João Luis Garcia do Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina/PR. Paralelamente a infecção dos pombos um grupo de camundongos foi também infectado, com a finalidade de confirmar a viabilidade dos oocistos. Todos os camundongos se infectaram.

Os pombos sorologicamente negativos foram divididos em quatro grupos, de quatro pombos cada, sendo que para cada grupo três aves foram inoculadas, via papo, com 50 oocistos esporulados de *T. gondii* cada e uma foi mantida sem infecção como controle negativo.

A contagem dos oocistos foi feita em câmara de Neubauer e observou-se que estes possuíam taxa de esporulação de 95 %.

Os grupos foram observados por períodos que variam de 15 a 60 dias (Tabela 1). Semanalmente sangue foi colhido de cada uma das aves para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*.

Tabela 1 – Período de observação em dias pós-infecção (d.p.i.), de cada grupo experimental.

Grupo	Nº de pombos	Período de observação (d.p.i.)	Pombos Nº.
1	4	15	1*, 2, 3, 4
2	4	30	5*, 6, 7, 8
3	4	45	9*, 10, 11, 12
4	4	60	13*, 14, 15, 16

* 1 Pombo controle por grupo

Terminado o período de observação de cada grupo, os pombos foram eutanasiados com injeção intracardíaca de embutramida e iodeto de mebenzônio na dose de 0,3 mL/kg (T-61[®]; Intervet, Brasil), após sedação com uma associação de cloridrato de quetamina 10% (10 mg/kg) e xilazina 2% (1 mg/kg), por via intramuscular profunda. Nessa ocasião foi coletado sangue por punção intracardíaca e colhidos os órgãos para bioensaio em camundongos.

Os pombos que vieram a óbito antes da eutanásia foram necropsiados e examinados para a pesquisa de *T. gondii* no cérebro.

3.2.5 Isolamento de *T. gondii* em camundongos

3.2.5.1 Digestão péptica de tecidos

Após necropsia, os tecidos removidos (cérebro, coração, língua e musculatura peitoral) foram utilizados para o bioensaio em camundongos, que foi realizado segundo o protocolo de Dubey (1998). Os órgãos foram usados integralmente para o processamento.

Os cérebros foram macerados em gral e pistilo separadamente dos demais órgãos e homogeneizados com cinco volumes com NaCl 0,15 M (solução salina fisiológica). Os demais tecidos foram cortados em pequenos pedaços e o *pool* de tecidos foi homogeneizado com cinco volumes de salina, utilizando um homogeneizador de uso doméstico.

Ao material homogeneizado adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1-1,2 (pepsina 2,6 g; NaCl 5,0 g; HCl 7,0 mL; água destilada suficiente para 500 mL de solução) recém preparada e aquecida em banho-maria a 37 °C. A mistura foi incubada em banho-maria sob agitação a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, a suspensão foi coada através de duas camadas de gaze, o coado distribuído em cinco tubos cônicos de 50 mL e centrifugado a 1200 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada tubo foi neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio 1,2% (pH~8,3), recém preparado. A neutralização foi percebida visualmente pela mudança de cor do sedimento. Após homogeneização, o material foi transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 50 mL com salina e centrifugando a 1200 g por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o

sedimento foi ressuspenso com salina (v/v) contendo 2000 U de penicilina e 200 µg de estreptomicina por mililitro.

Imediatamente a amostra foi inoculada em grupos de cinco camundongos.

Devido ao baixo peso dos pombos, nem sempre foi possível alíquotar 50 g dos tecidos como previsto no protocolo. Em função disto, os cálculos foram adequados às quantidades de tecidos disponíveis.

3.2.6 Bioensaio em camundongos

Para a realização do bioensaio foram utilizados camundongos BALB/C, fêmeas, com idade ao redor de dois meses, provenientes do Biotério do Laboratório de Patologia Veterinária (VPT, FMVZ - USP).

Cada grupo foi constituído de cinco camundongos, alojados na mesma caixa, com água e ração *ad libitum*, sendo os camundongos identificados individualmente com brincos e marcados em locais diferentes do corpo com ácido pícrico.

Cada camundongo foi inoculado subcutaneamente com 1,0-1,2 mL da amostra digerida e observados diariamente. Os camundongos que vinham a óbito foram examinados para a pesquisa de *T. gondii* nos tecidos e os que sobreviviam até oito semanas pós infecção (p.i.), foram examinados sorologicamente para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, através do MAT, na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997b), como descrito no item 3.2.3. Para isso, a colheita de sangue foi feita por punção venosa submandibular utilizando agulha 40x12 (22G), sem a necessidade de sedação.

Após a colheita de sangue os camundongos foram eutanasiados com T61[®] na dose de 0,3 mL/kg, por via intrapulmonar e examinados para a pesquisa de *T. gondii* no cérebro.

3.2.7 Pesquisa de *T. gondii*

Impressões de pulmão e fragmentos do cérebro dos camundongos foram examinadas sob microscopia de luz, entre lâmina e lamínula, para a pesquisa de estágios de *T. gondii* (taquizoítos e/ou cistos). Cortava-se um fragmento do pulmão e removia-se o excesso de

sangue da superfície do corte, a qual era então aplicada sobre uma lâmina com uma gota de salina, cobria-se com uma lamínula e examinava-se à procura de taquizoítos. Fragmentos do cérebro de 3-5 mm² foram comprimidos entre lâmina e lamínula e examinados para a pesquisa de cistos. Os cérebros dos camundongos soropositivos e soronegativos foram examinados.

Considerou-se como infectados com *T. gondii*, os camundongos em que estágios do parasito foram encontrados em seus tecidos (DUBEY e BEATTIE, 1988).

3.2.8 Análise Molecular de *T. gondii*

Para evitar contaminações, todo material não descartável utilizado (vidraria, material cirúrgico, homogeneizador), em todas as fases do experimento, era submetido à fervura com água, lavagem com detergente neutro, enxágue em água corrente, imersão em HCl 0,1 N por 2 minutos, enxágue em água destilada e esterelização em forno a 180 °C por 2 horas.

Durante o bioensaio, foram separadas três alíquotas de 1,5 mL do homogeneizado de tecidos de cada amostra dos pombos (dos cérebros foi separada apenas uma alíquota), antes de acrescentar a pepsina ácida, em microtubos de 2,0 mL e armazenadas em freezer -70 °C para posterior análise da presença de *T. gondii* por métodos moleculares.

Dos camundongos positivos para cistos cerebrais dois, de cada um dos grupos, foram utilizados para pesquisa de *T. gondii* pela *Nested-PCR* (*n-PCR*).

3.2.8.1 Extração e purificação do DNA

A extração de DNA foi baseada nos protocolos descritos por Ausubel et al. (1999). Após o descongelamento dos tecidos dos pombos e dos camundongos, foram separados 500 µL de cada alíquota armazenada. As amostras foram lavadas três a quatro vezes com tampão Tris-EDTA (TE) (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), centrifugadas a 12000 g por 5 minutos a 4 °C. Foi adicionado ao sedimento de cada amostra o tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 25 mM; SDS 1%; 400 µg/mL de Proteinase K) e água ultrapura autoclavada para um volume final de 500 µL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-seco a 37 °C durante a noite, sob agitação de 1400 rpm, de 15 segundos a cada 15 minutos.

Foi adicionado fenol tamponado (v/v) às amostras e centrifugou-se a 15000 g por 5 minutos a 4 °C, após homogeneização. O sobrenadante (fase aquosa) foi recuperado e acrescentou-se clorofórmio e fenol (v/v) centrifugando-se novamente a 15000 g por 5 minutos a 4 °C, e recuperando-se o sobrenadante.

Ao sobrenadante foi adicionado TE (v/v) e clorofórmio (v/v), em seguida as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 15000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado (aproximadamente 400 µL).

Para a insolubilização do DNA, etanol absoluto foi adicionado às amostras (2x o volume final), que foram homogeneizadas e armazenadas em freezer a -20 °C durante a noite.

As amostras foram centrifugadas a 15000 g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi desprezado. Adicionavam-se 1000 µL de etanol 70% e centrifugava-se a 15000 g por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido na etapa anterior, foi desprezado e os microtubos foram dispostos em posição invertida para secagem em temperatura ambiente.

As amostras foram homogeneizadas com TE (1/10 do volume final de sobrenadante obtido) e incubadas em banho-seco pré-aquecido a 56 °C, por 10 minutos, sob agitação de 1400 rpm, de 10 segundos a cada 10 segundos, para a solubilização do DNA.

As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até a amplificação.

3.2.8.2 PCR e *Nested-PCR*

O DNA de *T. gondii* foi detectado pela *n*-PCR baseada em “primers” que amplificam um fragmento do gene B1, segundo Burg et al. (1989). A sequência de cada “primer” utilizado (YAI et al., 2003) está demonstrada no quadro 1. O par de “primers” externos T1 e T2 foi utilizado na PCR e o par de “primers” internos T3 e T4 na *n*-PCR, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados de 300 pb e 155 pb, respectivamente.

Quadro 4 – Sequência de bases dos “primers” utilizados nas reações de PCR e *Nested*-PCR para amplificação de fragmentos do gene B1 de *Toxoplasma gondii*.

“Primers”	Sequência de bases (5’ – 3’)
T1	AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA
T2	TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT
T3	TGGGAATGAAAGAGACGCTAATGTG
T4	TTAAAGCGTTCGTGGTCAACTATCG

Para uma reação de PCR de 50 µL, foi utilizada a seguinte mistura de reagentes:

- 25,2 µL de água ultra pura autoclavada;
- 5,0 µL de tampão de reação 10x (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9,0);
- 8,0 µL da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP);
- 2,5 µL do “primer” externo T1 (10 pmol/µL);
- 2,5 µL do “primer” externo T2 (10 pmol/µL);
- 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM);
- 0,3 µL de *taq* DNA polimerase (Platinum ® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen™, Brazil) (5 U/µL);
- 5,0µL da amostra de DNA extraído.

O ciclo empregado para amplificação de fragmentos de DNA do gene B1 de *Toxoplasma gondii* na PCR foi:

- Desnaturação inicial: 94 °C por 3 minutos;
- Desnaturação: 94 °C por 45 segundos;
- Hibridização: 55 °C por 1 minuto;
- Extensão: 72 °C por 1 minuto e 30 segundos;
- Extensão final: 72 °C por 10 minutos.

A partir da desnaturação, o ciclo é repetido por mais 25 vezes.

Para uma reação de 50 μL na *n*-PCR foi utilizada a seguinte mistura de reagentes:

- 29,2 μL de água ultra pura autoclavada;
- 5,0 μL de tampão de reação 10x (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9,0);
- 8,0 μL da mistura de dNTPs (200 μM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP);
- 2,5 μL do “primer” interno T3 (10 pmol/ μL);
- 2,5 μL do “primer” interno T4 (10 pmol/ μL);
- 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM);
- 0,3 μL de *taq* DNA polimerase (5 U/ μL);
- 1,0 μL da amostra de DNA amplificado pela PCR.

O ciclo empregado para amplificação de fragmentos de DNA do gene B1 de *Toxoplasma gondii* na *n*-PCR foi:

Desnaturação inicial: 94 °C por 3 minutos;

- Desnaturação: 94 °C por 45 segundos;
- Hibridização: 55 °C por 1 minuto;
- Extensão: 72 °C por 1 minuto e 30 segundos;
- Extensão final: 72 °C por 10 minutos.

A partir da desnaturação, o ciclo é repetido por mais 35 vezes.

A cada corrida de PCR e *n*-PCR a amostra RH (SABIN, 1941) foi incluída como controle positivo e a cada três ou quatro amostras, água ultrapura autoclavada foi incluída como controle negativo.

3.2.8.3 Análise do produto amplificado

Os produtos originados pela *n*-PCR foram dispostos em gel de agarose 2,0% corados com solução de brometo de etídeo (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em cuba horizontal com solução tampão TBE (Tris-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M), pH 8,0, juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases e, em seguida submetidos a eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 μL de cada amostra.

Após a corrida eletroforética, o gel foi observado sob transluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas. A documentação fotográfica foi realizada com o analisador de imagem AlphaImager® Imaging System (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA, USA).

3.3 EXPERIMENTO II: “Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em pombos (*Columba livia*) de vida livre”

3.3.1 Animais Experimentais

Foram capturados 126 pombos de vida livre, sendo 72 de Sorocaba/SP, 36 de Ibiúna/SP e 18 de São Paulo/SP. Essas capturas foram feitas no período de maio de 2007 a outubro de 2008.

As capturas em Sorocaba foram feitas com arapucas grandes com capacidade para aproximadamente 20 pombos e estas foram montadas no Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”. As capturas em Ibiúna e São Paulo foram feitas conforme descrito no item 3.2.1.

3.3.2 Colheita de sangue e órgãos

Foram colhidas amostras de sangue (aproximadamente 5 mL) de todos os pombos, por punção intracardíaca, após sedação com uma associação de cloridrato de quetamina 10% (10 mg/kg) e xilazina 2% (1 mg/kg), ambas de uso veterinário, por via intramuscular profunda. Depois da colheita de sangue, os pombos foram eutanasiados com injeção de T61® na dose de 0,3 mL/kg.

O sangue foi centrifugado a 600 g por 10 minutos para obtenção do soro e este foi aliquotado e mantido a -20 °C.

De todos os animais capturados, independente de serem positivos ou negativos pelo MAT, foram colhidos cérebro, fígado e coração para a pesquisa e tentativa de isolamento de *T. gondii* pelo bioensaio em camundongos, como descrito no item 3.2.6.

Foram utilizados no experimento camundongos albinos Swiss, fêmeas e machos, com idade ao redor de dois meses, provenientes do Biotério do VPS, FMVZ, USP.

A tabela 2 apresenta o número de camundongos utilizados no bioensaio relacionados aos pombos capturados.

Tabela 2 – Quantidade de camundongos inoculados por pombo, por tipo de tecido para o isolamento de *Toxoplasma gondii*.

Pombos N°.	N° de camundongos inoculados		
	Cérebro	<i>Pool</i> de órgãos	Total
1 a 50	1	1	2
51	2	2	4
52 a 108	1	2	3
109 a 126	2	3	5

4 RESULTADOS

Os resultados dos Experimentos I e II serão apresentados separadamente.

4.1 EXPERIMENTO I

4.1.1 Infecção experimental

Durante o período de observação, o pombo n^o 16, pertencente ao grupo 4, apresentou sinais clínicos de toxoplasmose tais como: perda de peso, desidratação, penas arrepiadas e diarreia . Veio à óbito no 23^o dpi e foram encontrados cistos do parasito nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente (Figura 1).

Todos os outros animais experimentais apresentaram-se saudáveis durante o período de observação.

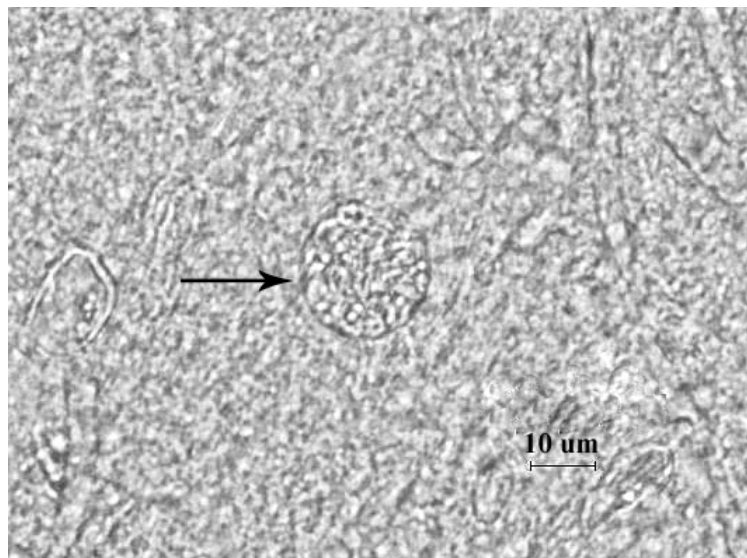


Figura 1 – Cisto de *Toxoplasma gondii* encontrado no cérebro do pombo n^o 16, experimentalmente inoculado com 50 oocistos esporalados.

4.1.2 Sorologia dos pombos

Dos 12 pombos inoculados, sete (58,33%) foram positivos para anticorpos anti-*T.gondii*, tanto no MAT quanto na RIFI, havendo concordância em todas as amostras entre as técnicas utilizadas. Os títulos variaram de 40 a 5120 no MAT e de 512 a 4096 na RIFI. A Tabela 3 apresenta o número de pombos soropositivos nas diferentes coletas.

Tabela 3 – Quantidade de pombos sorologicamente positivos (MAT e RIFI), por grupo experimental, nos diferente dias de coleta.

Dia Pós infecção	Nº de Pombos com Sorologia Positiva (MAT e RIFI) [£]			
	G1 (15 dpi)	G2 (30 dpi)	G3 (45 dpi)	G4 (60 dpi)
0	0	0	0	0
7	2	1	2	2
14	2	1	2	2
21	†	1	2	2
28	†	1	2	1*
35	†	†	2	1
42	†	†	2	1
49	†	†	†	1
56	†	†	†	1
60	†	†	†	1

dpi – dias pós inoculação; † - eutanásia; * - uma ave morreu de toxoplasmose; £ - mesmos animais positivos em todas as coletas

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

Foram realizados 16 bioensaios em camundongos, nas doze aves infectadas e nas quatro controles, obtendo-se um total de cinco (41,7%) isolados de *T. gondii* (Tabela 4).

No total 140 camundongos foram utilizados no bioensaio sendo que em 35 desses, o material inoculado teve como procedência animais controle, sem infecção. Dos 105 camundongos de pombos inoculados, somente um veio a óbito antes do 7º d.p.i. e no exame direto, taquizoítos não foram observados.

Tabela 4 – Número de camundongos infectados no bioensaio com tecidos de pombos inoculados experimentalmente com *T. gondii*.

Grupos	Identificação do Pombo	Sorologia	Nº de Camundongos Infectados	
			Cérebro (n = 5)	Pool de órgãos (n = 5)
G1	1*	N	£	0
	2	P	£	5
	3	N	£	0
	4	P	£	0
G2	5*	N	0	0
	6	N	0	0
	7	P	0	5
	8	N	0	0
G3	9*	N	0	0
	10	P	5	0
	11	P	5	4
	12	N	0	0
G4	13*	N	0	0
	14	P	3	5
	15	N	0	0
	16	P	0	0

£ Não houve a separação de cérebro e órgãos para inoculação nos camundongos – pool; * Controle negativo; n = nº de camundongos inoculados; N = negativo; P = positivo

4.1.4 Análise molecular dos tecidos

Para confirmar os resultados das sorologias e do bioensaio em camundongos foi feita a *nested*-PCR de todos os pombos e dos camundongos positivos ao bioensaio.

4.1.4.1 *n*-PCR dos pombos

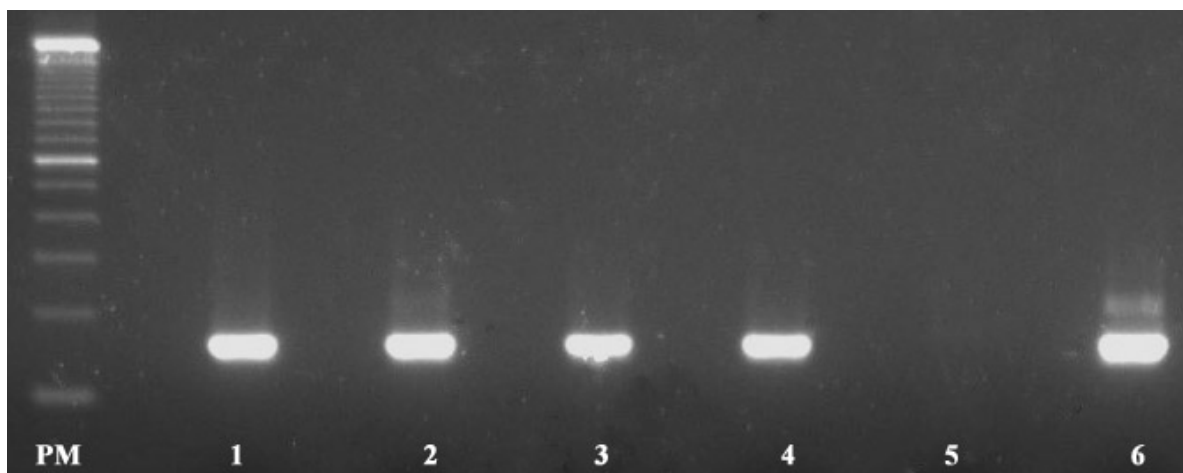
Dos doze pombos infectados, sete (58,33%) foram positivos e dos quatro pombos controle, todos foram negativos pela *n*-PCR. A Tabela 5 ilustra os resultados da PCR com os tecidos dos pombos experimentais.

Tabela 5 – Número de amostras positivas (examinadas) pela *Nested*-PCR dos pombos dos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Nº do pombo	<i>Nested</i> -PCR	
		Cérebro	<i>Pool</i> de órgãos
G1	1*	£	0 (3)
	2	£	3 (3)
	3	£	0 (3)
	4	£	3 (3)
G2	5*	0 (1)	0 (3)
	6	0 (1)	0 (3)
	7	1 (1)	3 (3)
	8	0 (1)	0 (3)
G3	9*	0 (1)	0 (3)
	10	1 (1)	0 (3)
	11	1 (1)	2 (3)
	12	0 (1)	0 (3)
G4	13*	0 (1)	0 (3)
	14	1 (1)	3 (3)
	15	0 (1)	0 (3)
	16	1 (1)	3 (3)
Total		5 (12)	17 (48)

£- não houve separação de cérebro e órgãos; * pombo controle negativo

A Figura 2 ilustra o resultado da *nested*-PCR do *pool* de órgãos de pombos dos diferentes grupos experimentais.



PM: peso molecular de 100bp; linhas 1, 2, 3 e 4 correspondem aos pombos 2, 7, 11 e 14, respectivamente dos grupos 1, 2, 3 e 4; linha 5: controle negativo; linha 6: controle positivo.

Figura 2 – *n*-PCR, em gel de agarose a 2%, de pombos dos diferentes grupos experimentais.

4.1.5 Comparação entre as técnicas utilizadas

A tabela 6 sumariza os resultados dos diferentes grupos experimentais e as técnicas utilizadas no experimento.

Tabela 6 – Comparação das diferentes técnicas utilizadas (MAT, RIFI, Bioensaio em Camundongos e *nested*-PCR) para a detecção de *Toxoplasma gondii* em pombos experimentalmente infectados, utilizando material biológico do dia da eutanásia.

Grupo	Identificação do Pombo	MAT	RIFI	Bioensaio	<i>nested</i> -PCR
G1	1 [§]	< 5	< 4	N	N
	2	160	2048	P	P
	3	< 5	< 4	N	N
	4	1280	2048	N	P
G2	5 [§]	< 5	< 4	N	N
	6	< 5	< 4	N	N
	7	1280	4096	P	P
	8	< 5	< 4	N	N
G3	9 [§]	< 5	< 4	N	N
	10	640	4096	P	P
	11	1280	2048	P	P
	12	< 5	< 4	N	N
G4	13 [§]	< 5	< 4	N	N
	14	1280	4096	P	P
	15	< 5	< 4	N	N
	16 [†]	2560	2048	N	P

[§] Controle negativo; [†] Título correspondente a 21 dpi, data do óbito; N = negativo; P = positivo

4.2 EXPERIMENTO II

4.2.1 Sorologia dos pombos

Dos 126 pombos de vida livre, nenhum foi positivo para anticorpos anti-*T.gondii* apresentando título < 5 no MAT.

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

Foram realizados 126 bioensaios sendo inoculados 365 camundongos. Destes, morreram durante o período de observação (60 d.p.i.) 22 (6%) camundongos. Em nenhum dos camundongos que vieram a óbito, formas de *T. gondii* foram encontradas.

Quatro (1,1%) camundongos apresentaram sinais neurológicos, porém estes animais não vieram à óbito. Todos os camundongos estavam sorologicamente negativos (MAT <25) quando examinados no final do bioensaio. Cistos de *T. gondii* não foram encontrados nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram consideradas infectados pelo *T. gondii* os pombos que foram positivos em uma ou mais das técnicas de diagnóstico utilizadas, isto é: técnicas sorológicas, biológicas ou moleculares.

Em relação à infecção experimental dos pombos observou-se que o uso de 50 oocistos esporulados de *T. gondii*, via papo, causou a infecção em 58,33% (7/12) das aves, sendo esse resultado confirmado pela soroconversão ($\text{MAT} \geq 5$ e $\text{RIFI} \geq 4$) observada nesses animais e pelo encontro do parasito pela PCR nas mesmas aves. Em estudo feito por Biancifiori et al. (1986), com a mesma dose de oocistos, os autores observaram infecção em 100% das aves, entretanto utilizaram somente cinco pombos e a cepa utilizada (RH) foi diferente da cepa do presente estudo (VEG).

Soros foram colhidos semanalmente após a inoculação e anticorpos anti-*T. gondii* foram primeiramente detectados no 7º dia p.i. Mineo et al. (2009) observaram títulos elevados já no 5º d.p.i., pela RIFI, utilizando conjugado anti-galinha, entretanto, nesse estudo, a infecção foi realizada com taquizoítos, via intraperitoneal, sendo provavelmente uma das razões do aparecimento de anticorpos neste pequeno intervalo depois da infecção. Importante lembrar que no presente estudo as aves não foram sangradas antes do dia 7 p.i.

Todos os soros dos pombos que foram positivos para o MAT também foram positivos para a RIFI, indicando que ambas as técnicas podem ser utilizadas como diagnóstico para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em pombos e que o conjugado anti-pássaro, utilizado na RIFI, neste estudo, foi eficaz para o diagnóstico nessas aves. Vale lembrar que no conjugado anti-pássaro (*Goat anti-Bird IgG+I, FITC Conjugated, Bethyl Laboratories, Inc., USA*), estão incluídos soros de pombo, pato, pardal e galinha. Dubey et al. (1993a,b, 1994a,b, 1995b) e Sedlak et al. (2000), em estudos com diferentes espécies de aves, também concluíram que MAT e RIFI são métodos eficazes para o diagnóstico de anticorpos anti-*T.gondii* em aves galináceas.

No dia da eutanásia dos animais de cada um dos grupos, os pombos positivos sempre apresentaram títulos elevados de anticorpos, isto é $\text{MAT} \geq 160$ e $\text{RIFI} \geq 2048$. Esses valores estão em concordância com estudos feitos por Mineo et al. (2009) e Biancifiori et al. (1986), que também descevem títulos elevados nas primeiras semanas depois da infecção.

No presente estudo, a presença de anticorpos foi estudada somente até o 60º dia p.i., não permitindo afirmar se após esse período os títulos ainda seriam detectados pelas técnicas utilizadas, sendo uma informação importante para futuros estudos e para melhor compreensão

dos resultados de levantamentos epidemiológicos nesta espécie animal. Mineo et al.(2009) observaram que títulos de anticorpos anti-*T. gondii* tiveram picos entre dez e 15 dias seguidos de acentuada diminuição, apesar de serem detectados até o final do experimento, 45 dias, quando as aves foram sacrificadas.

A pesquisa de DNA do *T. gondii* pela *Nested-PCR* mostrou-se sensível na detecção do agente em cérebros e órgãos dos pombos infectados com oocistos. No total, 41,66% (5/12) das amostras de cérebro e 35,42% (17/48) das amostras de órgãos examinadas foram positivas pela *n-PCR*, indicando ser o cérebro mais sensíveis apropriado para o isolamento do parasito.

No grupo 1, cérebros não foram separados dos órgãos para o bioensaio em camundongos. Amostras de *pool* de órgãos do pombo nº 10 não foram positivas pela PCR, porém a amostra do cérebro foi, sendo o único animal em que as amostras de cérebro e de *pool* de órgãos não apresentaram concordância nos resultados.

A dose de 50 oocistos foi letal apenas para um pombo que veio à óbito no 20º dia p.i. e, nesta ave, cistos de *T. gondii* foram observados no cérebro. Entretanto, o bioensaio em camundongos desse animal foi negativo. Este é um resultado não esperado uma vez que o bioensaio é considerado uma prova de alta sensibilidade (DUBEY et al., 2005a,b,c). Nesse estudo, a sensibilidade do bioensaio em camundongos foi menor do que em outros estudos com galinhas (DUBEY et al., 2002, 2003a,b, 2007b). O bioensaio é uma prova importante e que auxilia muito em estudos com coccídios, em especial quando se quer conhecer a patogenicidade dos isolados, o que não foi o objetivo deste trabalho.

No total, 22,86% (32/140) dos camundongos inoculados com tecidos dos pombos experimentais infectaram-se por *T. gondii*. Apenas dois camundongos vieram à óbito, porém a causa do óbito provavelmente não foi a toxoplasmose, uma vez que morreram antes do 7º dia p.i., não sendo encontradas formas de *T. gondii* nos tecidos examinados.

Toxoplasma gondii, pelo bioensaio em camundongos, foi isolado dos tecidos de cinco de 12 (41,7%) pombos que receberam os oocistos esporulados. O pombo nº 4, do grupo sacrificado aos 15 dias p.i., não foi positivo no bioensaio, mas a infecção foi confirmada pelas outras técnicas. Nessa ave, cistos de *T. gondii* não foram observados no cérebro, sendo indicativo de infecção recente (DUBEY et al., 2002, 2003a,b, 2006a, 2007b) uma vez que esta ave havia sido infectada há somente 15 dias.

Camundongos que receberam cérebro do pombo nº 7 e os camundongos que receberam *pool* de órgãos do pombo nº 10, não se infectaram, apesar dessas duas aves serem positivas pelas outras técnicas. Dubey et al. (2005a) descrevem que o sucesso do isolamento depende

do número de camundongos inoculados, quantidade de tecidos utilizados e a concentração de parasitas em amostras de tecidos.

Em todos os camundongos sorologicamente negativos cistos de *T. gondii* não foram encontrados nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente, indicando que a soroconversão nos camundongos é um grande indicativo da presença do parasito. Todos os camundongos sorologicamente positivos sobreviveram até o término do período experimental e estavam infectados com *T. gondii*, sendo encontrados cistos nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente. Apesar de terem sobrevivido esses camundongos apresentaram baixo desenvolvimento, pêlos eriçados e desidratação assim como observado por Peixoto e Lopes (1995) em estudo avaliando a patogenicidade do *T. gondii* de galinhas “caipiras” em camundongos.

O estudo com infecção experimental confirmou que as técnicas sorológicas utilizadas, isto é MAT e RIFI, as quais vêm sendo amplamente usadas para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em amostra de animais, são eficazes e permitem a detecção de anticorpos por um período de, no mínimo 60 dias em soro de pombos. Com essa informação, foi proposto um o segundo estudo, para avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em pombos de vida livre. Nesse estudo todos os pombos capturados foram testados somente pelo MAT, por esta ser uma técnica mais rápida, sem a necessidade do uso de conjugados e por ter apresentado resultados totalmente concordantes com a RIFI.

Todas as 126 aves apresentaram-se negativas para anticorpos anti-*T. gondii*. A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em outros estudos realizados nos EUA (KIRKPATRICK et al., 1990), China (TSAI et al., 2006), Portugal (WAAP et al., 2008) e Israel (SALANT et al., 2009), com pombos de vida livre, foi baixa, entre 4,04 e 5,9%, quando comparado a estudos com outras aves, como galinhas.

O bioensaio em camundongos foi realizado em todos os pombos de vida livre capturados, soropositivos e negativos. Isto porque estudos anteriores realizados por Dubey et al. (2002, 2003a,b, 2005a, 2007b), com galinhas “caipiras”, *T. gondii* foi isolado pelo bioensaio mesmo quando tecidos de galinhas MAT negativas foram utilizados. Vale ressaltar que nos estudos de Dubey e colaboradores o bioensaio das aves negativas foi feito em gatos e não em camundongos, porém Silva et al. (2003) obtiveram 23,5% (4/17) de isolados de *T. gondii* utilizando tecidos de galinhas soronegativas para o MAT através do bioensaio em camundongos.

Com a tentativa de isolamento em camundongos, além da sorologia, acreditou-se aumentar o poder de diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* nas aves, em especial naquelas

que pudessem ter tido contato com o agente há um tempo longo ou bastante recente, nas quais anticorpos poderiam não ser detectados e cistos poderiam estar presentes e viáveis.

Sabe-se que o carnivorismo, com ingestão de oocistos teciduais de *T. gondii* pelos gatos, é a forma mais eficiente de infecção nos hospedeiros definitivos (Dubey, 2006), sabe-se também que os felídeos, em geral, são excelentes predadores, sendo uma importante forma de manutenção e de sucesso do *T. gondii* no ambiente. Deste modo as aves seriam consideradas importantes reservatórios do *T. gondii*, uma vez que esses animais são frequentemente caçados por felídeos, inclusive os gatos.

Os pombos se adaptam muito bem nos centros urbanos, se proliferando sem controle e não são seletivos em relação à alimentação, consumindo inclusive lixos, que certamente estão contaminados pelo *T. gondii*. Também por serem aves que voam longas distâncias e que se alimentam no solo, seriam potenciais hospedeiros desse coccídio. Entretanto, no presente estudo a importância dos pombos na epidemiologia do *T. gondii* nos locais examinados não foi confirmada.

Apesar da amostragem ter sido relativamente grande para o processamento no laboratório, pode-se considerá-la pequena em termos epidemiológicos, visto que essas aves encontram-se nos municípios amostrados, em grandes quantidades. Também acredita-se que caso um maior número de aves tivesse sido obtido de um mesmo local, as chances de encontro de pombos positivos, numa menor área, tivessem sido maiores. Somado a isso, a amostragem aqui realizada enfocou aves de meio urbano e semi urbano, diversificando ainda mais as características das áreas amostradas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que:

As técnicas sorológicas MAT e RIFI podem ser utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em pombos;

Conjugado anti-pássaro comercialmente disponível, pode ser utilizado na RIFI com soros de pombos positivos a anticorpos anti-*T. gondii*.

O bioensaio em camundongos, a pesquisa de anticorpos séricos e a *nested* PCR confirmaram a infecção dos pombos;

Pombos de vida livre capturados nos municípios de Ibiúna, Sorocaba e São Paulo não estavam infectados com *T. gondii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

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

AMBIENTE BRASIL. **Ambientes Urbanos: Pragas Urbanas**. Pombos (*Columba livia*). Disponível em: <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/urbano/pragas_urbanas/pombos_%28columba_livia%29.html>. Acesso em: 10 nov. 2009.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K (Ed.) **Short protocols molecular biology**. 4th ed. New York: Wiley, 1999. sections 2-3 – 2-7.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WILKEN DE ABREU, A. M.; AZEVEDO-SILVA, J.; ORE'FICE, F. Toxiplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.133-136, 2001.

BIANCIFIORI, F.; RONDINI, C.; GRELLONI, V; FRESCURA, T. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.9, n.4, p.337-346, 1986.

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.

BURG, J. L.; GROBER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p. 787-792, 1989.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 117-118, 1964.

CATÁR, G. Toxoplazmóza v ekologických podmienkach na Slovensku (in Slovakian). **Biologické Práce (Bratislava)**, v.20, p.1-138, 1974.

COTTELEER, C., FAMERÉE, L. Parasites intestinaux et anticorps antitoxoplasmiques chez les colombins en Belgique. **Schweizer Archiv fur Tierheilkund**, v.120, p.181-187, 1978.

CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitology Research**, v.77, n.2, p.266-268, 1991.

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

de OLIVEIRA, L. N.; COSTA Jr., L. M.; RAMOS SILVA, J. C.; BEVILAQUA, C. M.; AZEVEDO, S. S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO, D. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. **Journal of Parasitology**, v.95, n.1, p.235-237, 2009.

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

DUBEY, J. P. Tissues cyst tropism of *Toxoplasma gondii* a comparison of tissue cyst formation in organs of cat and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 15-20, 1997a.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.44, n.6, p.592-602, 1997b.

DUBEY, J. P.; Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n.1, p. 75-77, 1998.

DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal of Parasitology**, v.87, n.1, p.215-219, 2001.

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

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

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. Toxoplasmosis in birds. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988. p.151-153.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v.19, n.4, p.337-339, 1987.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v.23, n.4, p.537-546, 1976.

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

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experiment Medicine**, v.132, n.4, p.636-662, 1970a.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.53, n.6, p. 447-456, 1970b.

DUBEY, J. P.; CAMARGO, M. E.; RUFF, M. D.; WILKINS, G. C.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in turkeys. **Journal of Parasitology**, v.79, p. 949-952, 1993a.

DUBEY, J. P.; RUFF, M. D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in Bobwhite quail (*Colinus virginianus*), **Journal of Parasitology**, v.79, p.935-939, 1993b.

DUBEY, J. P.; GOODIN, M. A.; RUFF, M. D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in Japanese quail. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.216-221, 1994a.

DUBEY, J. P.; RUFF, M. D.; WILKINS, G. C.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H. Experimental toxoplasmosis in pheasants (*Phasianus colchicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.30, p.40–45, 1994b.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; POWELL E. C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *Toxoplasma gondii* by bioassay in mice and cat. **Journal of Parasitology**, v.81, n.1, p.48-53, 1995a.

DUBEY, J. P.; GOODWIN, M. A.; RUFF, M. D.; SHEN, S. K., KWOK; O. C. H.; WILKINS, G. L.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in chukar partridges (*Alectoris graeca*). **Avian Pathology**, v.24, p.95–107, 1995b.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; BLIXT, J. A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocyst. **Journal of Parasitology**, v.83, n.5, p.870-882, 1997.

DUBEY, J. P.; GARNER, M. W.; WILLETTE, M. M.; BATEY, K. L; GARDINER, C. H. Disseminated toxoplasmosis in magpie geese (*Anseranas semipalmata*) with large numbers of tissue cysts in livers. **Journal of Parasitology**, v.87, n.1, p.219-223, 2001.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n.1, p. 99-105, 2002.

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

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, 2003b.

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

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.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.67-72, 2005a.

DUBEY, J. P.; LENHART, A.; CASTILLO, C. E.; ALVAREZ, L.; MARCET, P.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in chickens from Venezuela: isolation, tissue distribution, and molecular characterization. **Journal of Parasitology**, v.91, n.6, p.1332-1334, 2005b.

DUBEY, J. P.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, v.91, n.6, p.1335-1339, 2005c.

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

DUBEY, J. P.; SU, C.; CORTÉS, J. A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J. E.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; LORA, F.; JIMENEZ, J.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v.141, n.1-2, p. 42-47, 2006b.

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

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. d. 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.43, p.182-188, 2007b.

FEDERAÇÃO COLUMBÓFILA BRASILEIRA. **Pesquisa Técnica**. Curiosidade. Disponível em: <<http://www.fcb.org.br/pagina.php?id=8>>. Acesso em: 25 nov. 2008.

FELDMAN, H. A.; SABIN, A.B. Skin reactions to toxoplasmic antigen in people of different ages without known history of infection. **Pediatrics**, v.4, p.798-804, 1949.

FRENKEL, J. K. False-negative serologic tests for *Toxoplasma gondii* in birds. **Journal of Parasitology**, v.67, n.6, p.952-953, 1981.

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

FRENKEL, J. K.; HASSANEIN, K. M.; HASSANEIN, R. S.; BROWN, E.; THULLIEZ, P.; QUINTERO-NUNEZ, R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panamá city, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.5, p.458-468, 1995.

FERREIRA, A. D. M.; VITOR, R. T. G.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v.6, p.22-33, 2006.

FONSECA, C. **Guia prático de doenças de pombos-correios**. 2000. Disponível em: <<http://pwp.netcabo.pt/cm.fonseca/pombos/doencas.htm#ANTIPARASITARIOS>>, Acesso em: 05 abr. 2009.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1993. p.114-118.

GIBBS, D.; BARNES, E.; COX, J. **Pigeons and Doves: A guide to pigeons and doves of the world**. New Haven, Connecticut, United States: Yale University Press, 2001.

GIBSON, C. L.; EYLES, D. E. *Toxoplasma* infections in animals associated with a case of human congenital toxoplasmosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.6, p.990-1000, 1957.

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

Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais. **Projeto: Patrimônio com menos pombos**. Cartilha de Controle e monitoramento da população de pombos. Belo Horizonte: 2006. Disponível em: <http://www.iepha.mg.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22&Itemid=144>. Acesso em: 09 de dez. 2008.

JACOBS, L.; MELTON, L.; JONES, F. F. The prevalence of toxoplasmosis in wild pigeons. **Journal of Parasitology**, v.38, p.457-461, 1952.

KAUFMAN, H. E.; MELTON, M. L.; REMINGTON, J. S.; JACOBS, L. Strains differences in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.45, n.2, p.189-190, 1959.

KAUFMAN, H. E.; REMINGTON, J. S.; JACOBS, L. Toxoplasmosis: the nature of virulence. **American Journal of Ophthalmology**, v.46, n.5, p.255-261, 1958.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A. J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, E. R.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, D. S. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v.33, n.9, p. 2980-2992, 2005.

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

KIRKPATRICK, C. E.; COLVIN, B. A.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* antibodies in common barn-owls (*Tyto alba*) and pigeons (*Columba livia*) in New Jersey. **Veterinary Parasitology**, v.36, p.177-180, 1990.

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

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

LEVINE, N. D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **Journal of Protozoology**, v.24, p.36-41, 1977.

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, P.; 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.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of encysted apicomplexans in muscles of raptors. **Veterinary Parasitology**, p.341-344, 1999.

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

LITERÁK, I.; HEJLICEK, K.; NEZVAL, J.; FOLK, C. Incidence of *Toxoplasma gondii* in populations of wild birds in the Czech Republic. **Avian Pathology**, v.21, p.659-665, 1992.

LÜDER, C. G. K.; GROSS, U. Toxoplasmosis: from clinics to basic science. **Parasitology Today**, v.14, n.2, p.43-46, 1998.

MANDELLI, G.; PERSIANI, G. Ricerche sierologiche sulla presenza e diffusione della toxoplasmosi nei piccioni torraioli (*Columba livia*). **La Clinica Veterinaria (Milano)**, v.89, p.161-166, 1966.

MANWELL, R. D.; DROBECK, H. P. Mammalian toxoplasmosis in birds. **Experimental Parasitology**, v.1, p.83-93, 1951.

MAROBIN, L.; FLÔRES, M. L.; RIZZATTI, B. B.; SEGABINAZI, S. D.; LAGAGGIO, V. R. A., GRIGULO, M.; SCALCO, M. A. Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) em diferentes criatórios do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.5-9, 2004.

MCCANNEL, C. A.; HOLLAND, G. N.; HELM, C. J.; CORNELL, P. J.; WINSTON, J. V.; RIMMER, T. G. Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. **American Journal of Ophthalmology**, v.121, n.1, p.35-46, 1996.

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

MURADIAN, V. **Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP)**. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2009.

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

NIEDEREHE, H. Toxoplasma-Infektion bei verwilderten Tauben. **Tierärztl. Umschau**, v.19, p.256–257, 1964.

PADORI, E. S. M. **Manual: Manejo de Pombos Urbanos**. Prefeitura do Município de SP. Secretaria Municipal da Saúde. Centro de Controle de Zoonoses. Divisão Técnica de Controle de Veteroes e Roedores. Setor de Culicídeos. Disponível em: <http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0028/PombosUrbanos.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2009.

PEIXOTO, C. M.; LOPES, C. W. G. Patogenicidade para camundongos do *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) (Apicomplexa: toxoplasmatinae) isolado de galinhas naturalmente infectadas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.1, p.37-41, 1995.

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.

PENDERGRAPH, G. E. A serological study of toxoplasmosis in wild pigeons and their possible role in its dissemination. **The Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society**, v.88, p.208–209, 1972.

REMYNGTON, J. S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMYNGTON, J. S.; KLEIN, J. O. (Ed.). **Infection diseases of the fetus and newborn infant**. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 140-267.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.29, n.6, p.1161-1166, 1980.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v.116, p.801-807, 1941.

SAEIJ, J. P. J., BOYLE, J. P., BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v.21, p.476-481, 2005.

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

SEDLÁK, K.; LITERÁK, I.; VITULA, F.; BENÁK, J. High susceptibility of partridges (*Perdix perdix*) to toxoplasmosis compared with other gallinaceous birds. **Avian Pathology**, v.29, p. 563–569, 2000.

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

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

SIIM, J. C.; BIERING-SORENSEN, U.; MOLLER, T. Toxoplasmosis in domestic animals. **Advance in Veterinary Science**, v.8, p.335–429, 1963.

SILVA, D. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; LEHMANN, T.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in Southern Brazil highly endemic to humans. **Journal of Parasitology**, v.89, n.2, p.394-396, 2003.

SIMITCH, T.; BORDJOCHKI, A.; SAVIN, Z.; MIKOVITCH, Z. Infection expérimentale du pigeon per os, avec la forme végétative et la forme kystique de *Toxoplasma gondii*. **Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France**, v.38, n.8, p.333-336, 1965.

SOARES, R. M. Caracterização molecular do *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.17-19, 2004. Suplemento 1.

SOUSA, A. J. G. **Caracterização ecológica e genética das populações de pombo-da-rocha (*Columba livia*) no Parque Natural do Douro Internacional**. Figueira de Castelo Rodrigo, Portugal: Instituto de Conservação da Natureza, Parque Natural do Douro Internacional, 2004. Relatório Final de Estágio.

SPRINGER, L. Toxoplasmosse epizoótica entre pombos. **Arquivos de Biologia**, v.26, p.74-76, 1942.

SZABO, K. A.; MENSE, M. G.; LIPSCOMB, T. P.; FELIX, K. J.; DUBEY, J. P. Fatal toxoplasmosis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). **Journal of Parasitology**, v.90, n.4, p.907-908, 2004.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v.36, n.7, p.841–848, 2006.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii* from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1217-1268, 2000.

TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. **Advances in Parasitology**, v.39, p.69-139, 1997.

TSAI, Y. J.; CHUNG, W. C.; LEI, H. H.; WU, Y. L. Prevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Pigeons (*Columba livia*) in Taiwan. **Journal of Parasitology**, v.92, n.4, p.871, 2006.

WAAP, H., VILARES, A.; REBELO, E.; GOMES, S.; ÂNGELO, H. Epidemiological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in urban pigeons from the area of Lisbon (Portugal). **Veterinary Parasitology**, v.157, n.3-4, p. 306-309, 2008.

WORK, T. M.; MASSEY, J. G.; LINDSAY, D.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in three species of native and introduced Hawaiian birds. **Journal of Parasitology**, v.88, n.5, p.1040-1042, 2002.

YAI, L. E. O.; CANÕN-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E. L.; CAMARGO, M. C G. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the south American opossum (*Didelphis marsupialis*) from city of São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.89, n.4, p.870-871, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)