



UNIVERSIDADE PARANAENSE

**SOROLOGIA, ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* DE
ROEDORES SINANTRÓPICOS COMENSAIS E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O PARASITO
EM AMOSTRAS DE TECIDOS**

JACQUELINE BATISTA DE ARAÚJO

UMUARAMA, 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Mestrado em Ciência Animal

**SOROLOGIA, ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* DE
ROEDORES SINANTRÓPICOS COMENSAIS E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O PARASITO
EM AMOSTRAS DE TECIDOS**

JACQUELINE BATISTA DE ARAÚJO

Dissertação apresentada a Universidade Paranaense como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

UMUARAMA, 2010



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Mestrado em Ciência Animal

JACQUELINE BATISTA DE ARAÚJO

**SOROLOGIA, ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* DE
ROEDORES SINANTRÓPICOS COMENSAIS E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O PARASITO
EM AMOSTRAS DE TECIDOS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva

Aprovada em: 02/03/2010

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva - Presidente
Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Profa. Dra. Lisiane de Almeida Martins

Umuarama, 02 de março de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e que inúmeras vezes esqueceram de si colocando-me em primeiro lugar em suas vidas.

Ao meu noivo, por sempre apoiar em minhas escolhas e me ajudar na busca de meus objetivos, fazendo-os seus objetivos também.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado a vida e sabedoria para fazer as escolhas corretas.

Ao Professor Dr. Aristeu Viera da Silva, por compartilhar comigo seus conhecimentos, pela orientação durante este trabalho e por acreditar na minha capacidade.

Aos acadêmicos PIBIC e PIC, Rodrigo José Mattei, Ronaldo César da Rosa, Luan Duarte Castaldo, Noemila Débora Kozesrki, Bruna Cássia da Silva, Patrícia Rodrigues Ribeiro, e à acadêmica do mestrado em Ciência Animal, Priscila Luiza de Mello, pela dedicação e empenho na consecução dos trabalhos laboratoriais.

Aos meus pais pela dedicação, amor e pelo incentivo constante aos estudos, tanto moral como financeiro.

À Maria Anastácia Manzano, que primeiro foi professora e tornou-se amiga. Obrigada por ter incentivado ao ingresso no mestrado, incentivo moral e financeiro. Obrigada por confiar em mim, na minha capacidade.

Ao meu noivo Mauro Alexandre, por toda sua dedicação, amor compreensão, apoio e pela ajuda durante as coletas em campo.

À Universidade Paranaense, através da Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e Pós-Graduação, pelo financiamento da pesquisa e das bolsas de iniciação científica dos acadêmicos de graduação, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica ao acadêmico Roger Estevam Soares.

"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna."

Baltasar Gracián



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Mestrado em Ciência Animal

ARAÚJO, J.B. SOROLOGIA, ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* DE ROEDORES SINANTRÓPICOS COMENSAIS E AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O PARASITO EM AMOSTRAS DE TECIDOS. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Paranaense, 2010.

RESUMO

Os roedores sinantrópicos comensais podem participar do ciclo epidemiológico de diversas enfermidades, entre elas a toxoplasmose. O presente trabalho objetivou verificar a infecção de roedores sinantrópicos em área urbana na cidade de Umuarama-PR e comparar a detecção de anticorpos contra *T. gondii* pelo método de aglutinação direta em amostras de fígado, baço e musculatura de camundongos cronicamente infectados, além de verificar a influência da autólise na performance da detecção de anticorpos em tecidos. Neste estudo foram verificados a presença de anticorpos séricos contra *Toxoplasma gondii* pelo método de aglutinação direta em 43 roedores capturados na área urbana de Umuarama, PR, Brasil. Além disso, amostras de cérebro e coração foram coletadas, digeridas em pepsina e inoculadas em camundongos para isolamento do parasito. As cepas isoladas foram submetidas à genotipagem *multilocus*. Todos os roedores foram soronegativos, e o parasito isolado de um *Mus musculus* e um *Rattus rattus*, sendo as cepas classificadas como similares a cepas de *T. gondii* isoladas anteriormente em gatos no Estado do Paraná. Diversos testes de detecção de anticorpos têm sido propostos desde a descrição inicial do teste de Sabin-Feldman, usualmente utilizando o soro sanguíneo como amostra para a detecção. Tecidos e líquidos fetais também podem ser utilizados para a pesquisa de anticorpos, entretanto poucos trabalhos comparam a performance desta detecção em amostras pareadas com soro sanguíneo, e a avaliação do efeito da autólise não foi verificado. Desta forma, este trabalho apresenta também os resultados de sensibilidade, especificidade e a eficiência do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de fígado, baço e musculatura, recém coletadas, ou autolisadas, oriundas de camundongos cronicamente infectados. A avaliação de anticorpos foi mais eficiente nas amostras de musculatura, seja naquelas recém coletadas, ou nas provenientes de tecidos autolisados.

Palavras-chave: Roedores sinantrópicos, tipagem de cepas, detecção de anticorpos em tecidos, curvas ROC.



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Mestrado em Ciência Animal

ARAÚJO, J.B. **SEROLOGY, ISOLATION AND GENOTYPING OF *Toxoplasma gondii* OF COMMENSAL RODENTS SYNANTHROPIC AND EXPERIMENTAL EVALUATION OF DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST THE PARASITE IN TISSUE SAMPLES.** 60 f. Dissertation (Master in Animal Science) - Universidade Paranaense, 2010.

ABSTRACT

Synanthropic commensal rodents may participate in epidemiological cycle of many diseases, including toxoplasmosis. This work aims to verify the infection of synanthropic rodents in the urban area of Umuarama municipality, PR, and compare the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by modified agglutination test in samples of liver, spleen and muscular tissue of chronically infected mice, besides verify the influence of autolysis in the performance of antibody detection in tissues. Anti-*T. gondii* antibodies were verified by modified agglutination test in 43 rodents captured in Umuarama urban area, PR, Brazil. Samples of heart and brain are collected, digested by pepsin and inoculated in mice for parasite isolation. Isolated strains were submitted to multilocus genotyping. All rodent are serum negative, but the parasite were isolated from one *Mus musculus* and one *Rattus rattus*, being the strains classified as similar to strains of *T. gondii* isolated from cats in Parana State. Many antibody detection tests have been proposed until initial description of Sabin-Feldman dye test, usually using sera from blood as sample for detection. Tissues and fetal fluids may be utilized for antibody detection too, although few research compare the performance of this detection in paired samples of blood sera, and the evaluation of autolysis effect was not been verified. This research presents results of sensibility, specificity and the efficiency of modified agglutination test in anti-*T. gondii* antibody detection in samples of liver, spleen and muscle, freshly collected or autolysed, from chronically infected mice. Antibody evaluation were more efficient in freshly and autolysed muscle samples.

Key-words: Synanthropic rodent, strain typing, tissue antibody detection, ROC curve.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Isolation and multilocus genotyping of <i>Toxoplasma gondii</i> in seronegative rodents in Brazil | 9 |
| 1. Introduction..... | 9 |
| 2. Material and Methods..... | 10 |
| 3. Results..... | 12 |
| 4. Discussion | 12 |
| Conflicts of interest..... | 14 |
| Acknowledgements | 14 |
| References | 15 |
| Isolamento e genotipagem <i>multilocus</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> de roedores soronegativos do Brasil..... | 19 |
| 1. Introdução..... | 20 |
| 2. Material e Métodos..... | 21 |
| 3. Resultados..... | 23 |
| 4. Discussão | 24 |
| Conflito de interesses..... | 27 |
| Agradecimentos..... | 27 |
| Referências | 27 |
| Avaliação da detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> pelo método de aglutinação direta em tecidos de camundongos experimentalmente infectados. | 31 |
| Introdução..... | 32 |
| Material e Métodos..... | 34 |
| Resultados e Discussão..... | 36 |
| Agradecimentos..... | 41 |
| Referências bibliográficas | 41 |
| Apêndice 1: Figuras..... | 43 |
| Anexo 1: Certificados do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal | 45 |
| Anexo 2: Norma do periódico <i>Veterinary Parasitology</i> (ISSN 0304-4017)..... | 48 |
| Anexo 3: Norma do periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (ISSN 0103-846X)..... | 55 |
| Anexo 4: Classificação dos periódicos na Qualis | 57 |
| Anexo 5: Comprovação de submissão..... | 59 |

1 Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil

2 Jacqueline B. Araújo^a, Aristeu V. da Silva^{a*}, Ronaldo C. Rosa^b, Rodrigo J. Mattei^b, Rodrigo C.
3 Silva^c, Virginia B. R. Pereira^c, Helio Langoni^c

4 ^a Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282,
5 Centro, Umuarama 87.502-210, Paraná, Brasil

6 ^b Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná,
7 Brasil

8 ^c Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública,
9 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São
10 Paulo, Brasil

11 * Corresponding author. Tel.: +55 44 3622 5126; fax: +55 44 3621 2885.

12 *E-mail address:* silva.av@uol.com.br (Aristeu V. da Silva)

13 Abstract

14 Synanthropic commensal rodents, mainly rats and mice, are those animals ecologically associated
15 with humans due to the changes in their environments caused by human activities. These animals
16 may take part in the epidemiological cycles of several diseases, including toxoplasmosis. This study
17 assessed the presence of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in 43 rodents captured in the
18 urban area of Umuarama, PR, Brasil, using the modified agglutination test. Besides, heart and brain
19 samples were collected, digested in pepsin and inoculated in mice for the isolation of the parasite.
20 Isolated strains were analyzed by multilocus genotyping. All rodents were seronegative and the
21 parasite was isolated in one mouse (*Mus musculus*) and one rat (*Rattus rattus*). Classification of the
22 strains showed that they were similar to *T. gondii* strains isolated from cats in the state of Parana.

23 **Keywords:** Toxoplasmosis; *Mus musculus*; *Rattus rattus*; antibody detection; bioassay; strain
24 typing

25 1. Introduction

26 Rodents (MAMMALIA, RODENTIA) have an enormous ability to adapt, and may live in
27 any terrestrial environment. Synanthropism in some species are related to the effect of human
28 activities in their environments. The most important synanthropic commensal species are *Rattus*
29 *norvegicus*, *Rattus rattus* and *Mus musculus* (Brasil, 2002).

30 Disorganized population growth and development of towns, cities and megalopolises lead to
31 basic sanitation problems and offer ideal conditions not only for the establishment of a commensal
32 relationship between rodents and humans, but also for their proliferation. This synanthropism
33 causes economic and sanitary problems of importance both in rural and urban areas (Brasil, 2002;
34 Querino et al., 2003).

35 Toxoplasmosis is one of the diseases in which rodents have an important role as
36 intermediate hosts (Bevilaqua; Carmo; Giudice, 2004; Brasil, 2002). The epidemiological
37 importance of *T. gondii* infection in rodents is related to the fact that these animals may work as
38 sources of cysts for pigs, dogs and possibly cats, all of which have been reported to feed on rodents
39 (Murrell et al., 1984; Childs, 1986). Besides, they may infect other rodents, either by congenital
40 transmission or by cannibalism (Murphy et al., 2008).

41 Despite the reports on *T. gondii* natural infection in rodents all over the world assessed by
42 the presence of serum antibodies, parasite isolation in rodents and DNA detection (Dubey; Frenkel,
43 1998), few trials have been carried out in Brazil, mainly involving the isolation and genotyping of
44 the strains. The objective of this study was to assess the occurrence of infection in synanthropic
45 commensal rodents of urban areas in Brazil by means of antibody detection and isolation in mice,
46 followed by strain genotyping.

47 **2. Material and Methods**

48 **2.1. Capture of the rodents**

49 This study was analyzed and approved by the Animal Ethics Committee of *Universidade*
50 *Paranaense*, Umuarama, PR, Brazil.

51 Synanthropic commensal rodents were captured in Sherman traps and cages placed where
52 their presence had been reported or where there were signs (stains, feces) of their presence. Twenty
53 traps were placed every week in predetermined places. Traps were checked every day for the
54 presence of animals. Captured rodents were transported to the laboratory (*Laboratório de Medicina*
55 *Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense*)
56 where samples were collected for examination.

57 **2.2. Collection of the samples**

58 In the laboratory, captured animals were anesthetized using halothane in an anesthesia
59 chamber. After reaching the anesthetic plane, biometrical data was collected and the species was
60 identified (Brasil, 2002). Blood samples were collected from the anesthetized animals using the
61 retro-orbital sinus. Blood samples were stored in microtubes labeled with a protocol number. After
62 that, animals were killed by anesthetic overdose.

63 After collection, blood samples were centrifuged at 1650 g for 15 minutes for serum
64 separation. Aliquots of up to 1.0 mL of serum were stored at -20°C in adequately labeled plastic
65 microtubes until the moment of analysis for the presence of antibodies anti- *Toxoplasma*.

66 **2.3. Detection of antibodies anti-*Toxoplasma gondii***

67 Detection of antibodies anti-*Toxoplasma* was carried out by means of the modified
68 agglutination test (MAT) using formalin-fixed antigens and sera diluted 1:10 (Desmonts;

69 Remington, 1980). In each test run, sera from mice known to be positive or negative in MAT were
70 analysed as controls.

71 **2.4. Isolation in mice**

72 Brain and heart samples collected from the rodents were processed for isolation in Swiss
73 Webster mice, according to the protocol by Dubey (1998). Samples of animals positive in MAT
74 were individually processed, whereas for seronegative rodents, brains and hearts of up to five
75 animals were pooled together. Five mice were inoculated by subcutaneous route with each digested
76 sample. Inoculated animals were kept under controlled photoperiod and temperature, were offered
77 water and feed *ad libitum*, and were observed for 60 days. All mice were killed 60 days after the
78 inoculation, and blood was collected for MAT detection of antibodies anti-*Toxoplasma*. The brains
79 of these animals were also analyzed for the presence of parasites after maceration and resuspension
80 in 0.18% saline. Samples were considered positive when showed cysts in brain macerates, or
81 showed positive results in MAT (Dubey; Beattie, 1988).

82 **2.5. Molecular detection and genotyping of *T. gondii* isolates**

83 Brain samples of seropositive mice and /or those that showed tissue cysts were sent to the
84 *Grupo de Pesquisa em Zoonoses* (NUPEZO) from *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*
85 at *Universidade Estadual Paulista*, UNESP – Botucatu Campus for DNA detection and genotyping.

86 Extraction and purification of DNA from tissue samples were carried out using the Illustra
87 Tissue and cells genomic Prep Mini spin kit (GE Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda.®, Brazil),
88 following the manufacturer's instructions. PCR was carried out using the primers described by
89 Homan et al. (2000), which amplify a 529bp fragment, AF146527 [Genbank], that is repeated 200-
90 to 300-times in *T. gondii* genome. Thus, primers TOX4
91 (5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3') and TOX5
92 (5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT3') were used. PCR was performed in the reaction
93 mixture containing 10pM of each primer (Prodimol, Brazil), 10X PCR buffer (50mM KCl, 10mM
94 Tris-HCl, Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil), 1.5mM MgCl₂ (Invitrogen, Brazil), 1.25mM dNTP
95 (Invitrogen, Brazil), 0.15U Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen, Brazil), and ultrapure water to
96 25µL. Amplification was performed in a MasterCycler EP gradient (Eppendorf, Brazil). Initial
97 denaturation for 7 minutes at 94°C was followed by 35 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 60°C
98 and 1 minute at 72°C, and final extension for 10 minutes at 72°C. The sequence was visualized by
99 electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide, and recorded using a digital gel-
100 documentation system (UVP, USA).

101 Strain typing was performed using 12 genetic markers SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6,
102 c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico and CS3, as described previously (Su et al., 2006; Ferreira et al.,

103 2006; Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008). An additional marker (ROP18) was included to
104 evaluate the virulence of the strains (Khan et al., 2009), as CS3 (Khan et al., 2005). Reference
105 strains (GT1, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS and TgCatBr5) were used as controls. Target DNA
106 sequences were first amplified by multiplex-PCR using external primers for all markers followed by
107 genotyping using nested-PCR for individual markers, as described previously (Su et al., 2006;
108 Ferreira et al., 2006; Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008). All products were visualized by
109 electrophoresis in agarose gel (1.5, 2.5 or 3%, depending of the marker) stained with ethidium
110 bromide, and recorded using a digital gel-documentation system (UVP, USA).

111 3. Results

112 Forty-three rodents were captured. From this total, 44.2% were *Mus musculus* and 55.8%
113 were *Rattus rattus*. Among *M. musculus* specimens, 31.6% were male and 68.4% were females;
114 among *R. rattus*, 58.3% were males and 41.7% were females.

115 None of the animals was positive for antibodies anti-*Toxoplasma* in MAT. Even though
116 pooled brain and heart samples obtained from two *M. musculus* and four *R. rattus* were negative in
117 MAT, they were individually processed for isolation in mice. Samples from each of these six
118 animals were inoculated in five mice, in a total of 30 animals. For samples of the other 37 rodents,
119 up to five animals were pooled together and each pool was inoculated in five mice, in a total of 40
120 inoculated animals. After 60 days of observation, no clinical changes were observed in any of the
121 inoculated mice, and blood samples were collected for detection of antibodies anti-*T. gondii*. From
122 the 70 animals examined, five were positive in MAT in a dilution equal to 1:25. From these mice,
123 three were inoculated with the brain and heart pool of one synanthropic *M. musculus* and other two
124 inoculated with the brain and heart pool of one *R. rattus*. One *T. gondii* tissue cyst was found in the
125 brain macerate of one of the mice inoculated with the *R. rattus* sample. Brain samples of these
126 seropositive animals were submitted to DNA extraction and *T. gondii* genotyping.

127 Two *T. gondii* strains were isolated, *TgCatBr5* and *TgCatBr10*, both already described in the
128 literature. These strains were isolated from one *M. musculus* and one *R. rattus*, respectively. They
129 were originally isolated from cats by Dubey et al (2004) in the state of Parana, Brazil.

130 Based on these results, sera of this *M. musculus* and this *R. rattus* were reevaluated for the
131 presence of antibodies anti-*T. gondii* by means of MAT using two-fold dilutions from 1:2 to 256.
132 However, no antibodies were detected even in the lowest dilutions, or when samples were analyzed
133 in another laboratory (NUPEZO) using an antigen batch different from the initial one.

134 4. Discussion

135 This study involved the isolation and genotyping of *T. gondii* from urban synanthropic
136 rodents in the state of Parana, Brazil. No antibodies were detected in any of the 43 rodents analyzed.

137 In Brazil, Sogorb; Jamra; Guimarães (1977), in the state of Sao Paulo, studied toxoplasmosis
138 in birds and mammals, including eight *R. norvegicus* and four *R. rattus*. All *R. norvegicus* were
139 negative and two *R. rattus* were positive in Sabin-Feldman dye test. Ruffolo (2008; *unpublished*
140 *data*) studied 182 rodents in Londrina – Parana. From this total, seven were seropositive for *T.*
141 *gondii*. Muradian et al. (2008; *unpublished data*) analyzed 217 rodents in the city of Sao Paulo, and
142 only one of them was positive.

143 The analysis of international literature showed that detection of antibodies in *Rattus* have a
144 huge variation due to regional differences and to the method used. In 58 studies reviewed by Dubey
145 and Frenkel (1998), a total of 7,549 rodents were examined (average of 130 animals per study), and
146 16.37% were seroreactors. In more recent studies, Murphy et al. (2008) analyzed 200 *Mus*
147 *domesticus* in England and 59% were positive for *Toxoplasma*. Salibay; Claveria (2006) studied
148 chronic and acute toxoplasmosis cases in *R. norvegicus* and *R. rattus mindanensis* in rural and
149 urban areas of the Philippines and found antibodies against *T. gondii* in 58% *R. norvegicus* and in
150 42% *R. rattus mindanensis*.

151 Dubey and Frenkel (1998) reviewed 39 studies from a parasitological standpoint, showing a
152 total of 1,909 animals studied (average of 50 animals per study) and an isolation rate of 2.36%.
153 Many factors, such as oocyst shedding rate by cats and the climate may affect oocyst survival and
154 influence infection rates in rats. Hughes et al. (2006) detected *T. gondii* DNA in 53 of 100 *Mus* and
155 in 19 of 43 *Rattus* analyzed by them.

156 In this study, *T. gondii* was isolated from one *Mus musculus* and one *Rattus rattus*
157 seronegative in MAT, even in dilution 1:2. The isolation of the parasite in seronegative animals was
158 already reported in swine (Dubey et al., 2002), chickens (Dubey et al., 2005), six-banded armadillos
159 (da Silva et al., 2006), and arctic foxes (Prestrud et al., 2008). Specific DNA of the parasite was
160 detected in six of nine sparrows (*Passer domesticus*) seronegative for *T. gondii* studied by Gondim
161 et al. (2010) in the states of Bahia and Pernambuco, Brazil. In rodents, this occurrence was
162 described by Eyles (1952), who isolated *T. gondii* in mice using brain samples of one seronegative
163 *R. norvegicus*. It was also experimentally verified by Dubey et al. (1997), who reported tissue cysts
164 in 16 offspring born from female rats experimentally infected. From these 16 animals, five were
165 negative in Sabin-Feldman dye test (<1:4) and in MAT (<1:20). A possible explanation for this
166 behavior is that congenitally infected rodents exposed to the parasite during their initial intra-uterine
167 life would not developed a measurable antibody response (Murphy et al., 2008).

168 Recently, data on the genotyping of *T. gondii* strains from synanthropic rodents found in
169 urban areas have been published. In Crete Island, Greece, Messaritakis et al (2008) analyzed the
170 serum of 112 rats for antibodies anti-*T. gondii* using indirect immunofluorescence for IgG. DNA
171 was isolated from the brain of two seropositive rats, leading to detection of the parasite and its

172 classification as type III by means of the analysis of locus GRA6. In the state of Parana, Brazil,
173 Ruffollo (2008; *unpublished data*) isolated four *T. gondii* strains from *R. rattus* using the bioassay
174 and brain and liver samples of sixteen seropositive animals. The analysis of locus SAG2 in the
175 isolated strains showed one strain as type I and three strains as a combination of types I/III.

176 Strains isolated in this study had already been detected in cats and classified by Dubey et al.
177 (2004). It is interesting to note that the original isolation in cats occurred in the same state of this
178 study, and that the same strains were isolated also in 2009 from chickens raised in extensive
179 conditions in swine farms in the region of Toledo, Parana (*unpublished data*).

180 In this study, isolated strains showed to be avirulent for inoculated mice, which survived for
181 the 60 days of the observation period. Only tissue cysts (in one mouse), antibodies (in five mice) or
182 parasite DNA (in five mice) were observed. These results are contrary to the expectation raised by
183 the results obtained for CS3 marker (profile II), that is, of virulence for markers I or II (Pena et al.,
184 2008). When these strains were originally isolated in the cat bioassay using tissue samples of
185 naturally infected cats, they showed to be virulent for mice only when tachyzoites obtained from
186 infections caused by oocysts were used (Dubey et al., 2004). They were not isolated in mice after
187 the original inoculation of tissue samples obtained from the cats (Dubey et al., 2004). As observed
188 by Pena et al. (2008), virulence of the parasite for mice depends on several factors, which include
189 the stage of parasite development, route of infection, infective dose, mice lineage and parasite strain
190 (Dubey et al, 2004). Samples from strains *TgCatBr5* e *TgCatBr10* were isolated from chickens in
191 2009 in Toledo, Parana (*unpublished data*). When used in the mouse bioassay, *TgCatBr10* caused
192 death of mice in one of the nine samples and *TgCatBr5* in three of six samples. However, there was
193 a correlation between the initial infective dose, as assessed by real-time PCR, mortality and weight
194 loss among inoculated mice (*unpublished data*).

195 Results of the present study suggest that the identification of *T. gondii* infection in samples
196 obtained from synanthropic rodents should be examined not only by antibody detection methods,
197 but also by the mouse bioassay or parasite DNA detection in tissues, including seronegative
198 animals. On the other hand, multilocus genotyping enabled the detection in rodents of strains
199 already observed in cats and chickens, confirming the circulation of these strains in several species
200 that take part in the epidemiological cycle of *T. gondii*.

201 **Conflicts of interest**

202 None.

203 **Acknowledgements**

204 We would like to thank *Universidade Paranaense (UNIPAR)* for the grants (PIT and PIBIC
205 programs) and financial support (Process # 14707/2009).

206 **References**

- 207 Bevilacqua, P.; Carmo, R.F.; Silva, J.C.P.; Lessa, G. 2004. Roedores inventariados em hospital
208 veterinário e fragmento de mata nativa da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil: caracterização
209 populacional e infecção por *Leptospira* sp. *Ciência Rural*, 34, 1519-1523.
- 210 Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle de Roedores.
211 Brasília: FUNASA. 2002. 130p.
- 212 Childs, J.E., 1986. Size-dependent predation on rats *Rattus norvegicus* by house cats (*Felis catus*)
213 in an urban setting. *J. Mammol.* 67, 196–199.
- 214 Da Silva, A.V., Cutolo, A.A., Langoni, H.. 2006. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild
215 mammals Serological evidence in *Dasyprocta novemcinctus* Linnaeus 1758 and *Euphractus sexcinctus*
216 Wagler, 1830. *Vet. Parasitol.* 135, 81-83.
- 217 Desmonts, G., Remington, J.S., 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma*
218 infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology* 11,
219 562-568.
- 220 Dubey, J.P., Shen, S.K., Kwok, O.C., Thulliez, P. 1997. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*):
221 congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii*
222 from seronegative rats. *Parasitology*, 115, 9-14.
- 223 Dubey, J.P., Gamble, H.R., Hill, D., Sreekumar, C., Romand, S., Thuilliez, P. 2002. High
224 prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in
225 Massachusetts. *J Parasitol.* 88, 1234-1238.
- 226 Dubey, J.P., Navarro, I.T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R.L., Kawabata, H.H., Vianna, M.C.,
227 Kwok, O.C., Shen, S.K., Thulliez, P., Lehmann, T. 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from
228 Paraná, Brazil: Seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of
229 isolates. *J Parasitol.* 96, 721-726.

- 230 Dubey, J.P., Su, C., Oliveira, J., Morales, J.A., Bolaños, R.V., Sundar, N., Kwok, O.C.H., Shen,
231 S.K.. 2005. Genetic and Biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range
232 chickens from Colombia, South America. *Vet Parasitol.* 134, 67-72.
- 233 Dubey, J.P.; Frenkel, J.K. 1998 Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value
234 as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol*, 77, 1-32.
- 235 Dubey, J.P. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from
236 infected tissues. *Vet Parasitol*, 74, 75-77.
- 237 Dubey, J.P., Beattie, C.P. 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton,
238 220p.
- 239 Dubey, J.P., Sundar, N., Gennari, S.M., Minervino, A.H.H., Farias, N.A.D.R., Ruas, J.L., dos
240 Santos, T.R.B., Cavalcante, G.T., Kwok, O.C.H., Su, C., 2007. Biologic and genetic comparison of
241 *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern
242 state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet.*
243 *Parasitol.* 143, 182–188.
- 244 Eyles, D.E., 1952. *Toxoplasma* in the Norway rat. *J Parasitol*, 38, 226–229.
- 245 Ferreira, A.M., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of natural
246 recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect., Genet. Evol.* 6,
247 22–31.
- 248 Gondim, L.S.Q., Abe-Sandes, K., Uzeda, R.S., Silva, M.S.A., Santos, S.L., Mota, R.A., Vilela,
249 S.M.O., Gondim, L.F.P. 2010. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer*
250 *domesticus*) in the northeast of Brazil. *Vet Parasitol*, 168, 121-124.
- 251 Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200-
252 to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and
253 quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69–75.
- 254 Hughes, J.M. 2006. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii*
255 by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitol.* 132, 29-36.

- 256 Khan, A., Taylor, S., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2009. Selection at a single locus
257 leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. PLOS Gen.
258 5. doi:10.1371/journal.pgen.1000404.
- 259 Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A.J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tang, K., Paulsen, I.T.,
260 Berriman, M., Boothroyd, J.C., Pfefferkorn, E.R., Dubey, J.P., Ajioka, J.W., Roos, D.S., Wootton,
261 J.C., Sibley, L.D., 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three
262 archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nuc. Acids Res. 33, 2980–2992.
- 263 Messaritakis, I., Detsika, M., Koliou, M., Sifakis, S., Antoniou, M. 2008. Prevalent genotypes of
264 *Toxoplasma gondii* in pregnant women and patients from Crete and Cyprus. Am J Trop Med Hyg, 79,
265 205-209.
- 266 Murphy, R.G., Williams, R.H., Hughes, J.M., Hide, G., Ford, N.J., Oldbury, D.J. 2008. The urban
267 house mouse (*Mus domesticus*) as a reservoir of infection for the human parasite *Toxoplasma*
268 *gondii*: an unrecognized public health issue? Int J Environ Health Res, 18, 177-185.
- 269 Murrell, K.D., Gamble, H.R., Schad, G.A. 1984. Experimental transmission of *Trichinella spiralis*
270 to swine by infected rats. Proc Helminthol Soc Washington, 51, 66–68.
- 271 Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of
272 *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int. J. Parasitol. 38, 561–569.
- 273 Prestud, K.W., Asbakk, K., Mork, T., Fuglei, E., Tryland, M., Su, C. 2008. Direct high-resolution
274 genotyping of *Toxoplasma gondii* in arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in the remote arctic Svalbard
275 archipelago reveal widespread clonal Type II lineage. Vet Parasitol. 158, 121-128.
- 276 Querino, A.M.V., Delbem, A.C.B., Oliveira, R.C., Silva, F.G., Muller, E.E., Freire, R.L., Freitas,
277 J.C. 2003. Risk factors associated to leptospirosis in dogs in Londrina City – PR. Semina: Ciências
278 Agrárias, 24, 27-34
- 279 Salibay, C.C., Claveria, F.G. 2005. Serologic detection of *Toxoplasma gondii* infection in *Rattus*
280 spp collected from three different sites in Dasmariñas, Cavite, Philippines. Southeast Asian J Trop
281 Med Publ Health, 36, 46-49.

- 282 Sogorb, F., Jamra, L.F., Guimaraes, E. C. 1977. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil.
283 Rev Bras Med Trop São Paulo, 19, 191-194.
- 284 Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP
285 markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. Int. J. Parasitol. 36,
286 841–848.

1 **Isolamento e genotipagem *multilocus* de *Toxoplasma gondii* de roedores soronegativos do**
2 **Brasil**

3 Jacqueline B. Araújo^a, Aristeu V. da Silva^{a*}, Ronaldo C. Rosa^b, Rodrigo J. Mattei^b, Rodrigo C.
4 Silva^c, Virginia B. R. Pereira^c, Helio Langoni^c

5 ^a Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282,
6 Centro, Umuarama 87.502-210, Paraná, Brasil

7 ^b Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná,
8 Brasil

9 ^c Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública,
10 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São
11 Paulo, Brasil

12 **Resumo**

13 Os roedores sinantrópicos comensais, ou seja, aqueles que se associam ao ser humano em virtude de
14 terem seus ambientes prejudicados pela ação do próprio homem, principalmente os ratos e
15 camundongos, podem participar do ciclo epidemiológico de diversas enfermidades, entre elas a
16 toxoplasmose. Neste estudo foram verificados a presença de anticorpos séricos contra *Toxoplasma*
17 *gondii* pelo método de aglutinação direta em 43 roedores capturados na área urbana de Umuarama,
18 PR, Brasil. Além disso, amostras de cérebro e coração foram coletadas, digeridas em pepsina e
19 inoculadas em camundongos para isolamento do parasito. As cepas isoladas foram submetidas a
20 genotipagem multilocus. Todos os roedores foram soronegativos, e o parasito isolado de um *Mus*
21 *musculus* e um *Rattus rattus*, sendo as cepas classificadas como similares a cepas de *T. gondii*
22 isoladas em gatos no Estado do Paraná.

23 **Palavras-chave:** Toxoplasmose; *Mus musculus*; *Rattus rattus*; detecção de anticorpos; bioensaio;
24 tipagem de cepas.

25 1. Introdução

26 Os roedores (MAMMALIA, RODENTIA) possuem enorme variedade de adaptação
27 ecológica, podendo viver em qualquer ambiente terrestre. Algumas espécies apresentam ação
28 sinantrópica por terem seus ambientes prejudicados pela ação humana. As espécies sinantrópicas
29 comensais que mais se destacam são *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e o *Mus musculus* (Brasil,
30 2002).

31 O aumento populacional desordenado e o desenvolvimento de povoados, cidades e
32 megalópoles ocasionam problemas de saneamento básico e criam condições ideais à ligação
33 comensal dos roedores com o homem, assim como sua proliferação. Esse sinantropismo, tanto em
34 áreas urbanas quanto rurais, gera prejuízos econômicos e sanitários de relevância ao homem (Brasil,
35 2002; Querino et al., 2003).

36 Uma das doenças em que os roedores são importantes hospedeiros intermediários é a
37 toxoplasmose, onde atuam diretamente no ciclo da doença (Bevilaqua; Carmo; Giudice, 2004;
38 Brasil, 2002). A infecção pelo *T. gondii* em roedores pode ter importância epidemiológica, pois
39 estes animais podem servir como fonte de cistos teciduais para porcos, cães e possivelmente gatos,
40 animais onde já foi registrado o consumo de roedores (Murrell et al., 1984; Childs, 1986). Por outro
41 lado são fonte de infecção para os próprios roedores, seja pela infecção congênita, seja pela
42 possibilidade de canibalismo (Murphy et al., 2008).

43 A despeito de serem relatadas infecções naturais em roedores em todo o mundo, verificadas
44 pela presença de anticorpos séricos, isolamento em roedores e detecção de DNA (Dubey; Frenkel,
45 1998), poucos trabalhos foram realizados no Brasil, principalmente com o isolamento e
46 genotipagem das cepas. Este trabalho objetivou verificar a infecção de roedores sinantrópicos
47 comensais em área urbana no Brasil, pela detecção de anticorpos e isolamento em camundongos,
48 com posterior genotipagem das cepas isoladas.

49 **2. Material e Métodos**

50 **2.1. Captura dos roedores**

51 Antes do início da pesquisa a mesma foi submetida, avaliada e aprovada pelo Comitê de
52 Ética em Pesquisa Envolvendo Animais de Experimentação da Universidade Paranaense,
53 Umuarama, PR, Brasil.

54 Os roedores sinantrópicos comensais foram capturados em armadilhas tipo Sherman e tipo
55 gaiola, em locais com relatos ou sinais (manchas, fezes) de presença de roedores. Semanalmente
56 foram distribuídas vinte armadilhas de cada tipo em locais previamente determinados, com
57 checagem diária da captura. Os roedores capturados foram transportados para o Laboratório de
58 Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Mestrado em Ciência Animal da Universidade
59 Paranaense, onde foram submetidos à coleta de amostras para exames laboratoriais.

60 **2.2. Coleta de amostras**

61 No laboratório os animais capturados foram anestesiados em câmara saturada de vapor de
62 halotano; ao atingirem o plano anestésico foi realizada a biometria e procedida a identificação da
63 espécie (Brasil, 2002). Com os animais ainda anestesiados, amostras de sangue foram colhidas pela
64 punção do seio retroorbitário, sendo acondicionadas em microtubos, devidamente identificados por
65 um número de protocolo. A seguir os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento
66 anestésico.

67 Após a coleta das amostras de sangue, as mesmas foram centrifugadas a 1650 g por 15
68 minutos para promover a dessora, e alíquotas de até 1,0 mL de soro, armazenadas em microtubos
69 plásticos devidamente identificados a -20°C, até o momento da avaliação para a presença de
70 anticorpos anti- *Toxoplasma*.

71 **2.3. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii***

72 A detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* foi feita pelo método de aglutinação direta
73 (MAT), usando antígenos fixados pela formalina. Os soros foram avaliados à diluição 1:10

74 (Desmonts; Remington, 1980). Em cada teste foram avaliados soros de camundongos sabidamente
75 positivos ou negativos ao MAT.

76 **2.4. Isolamento em camundongos**

77 Amostras de cérebro e coração dos roedores foram processadas para isolamento em
78 camundongos Swiss Webster, de acordo com o protocolo de Dubey (1998). Amostras dos animais
79 positivos ao MAT foram processadas individualmente, enquanto *pools* de cérebro e coração de até
80 cinco animais soronegativos foram processadas em conjunto. Cinco camundongos foram
81 inoculados para cada amostra digerida, pela via subcutânea. Os animais inoculados foram mantidos
82 em observação por período de no máximo 60 dias, em sala com controle de temperatura e luz,
83 recebendo água e alimento *ad libitum*. Todos os camundongos foram abatidos aos 60 dias após a
84 inoculação, colhendo-se o sangue para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* pelo MAT. O
85 cérebro dos animais também foi examinado para a presença de formas parasitárias, após maceração
86 e ressuspensão em solução salina 0,18%. Foram consideradas positivas aquelas amostras em que se
87 observou cistos no macerado do cérebro, ou naqueles animais em que o MAT foi positivo (Dubey;
88 Beattie, 1988).

89 **2.5. Detecção molecular e genotipagem de amostras de *T. gondii* isoladas**

90 As amostras de cérebros de camundongos soropositivos e/ou com presença de cistos
91 teciduais foram encaminhadas ao Grupo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO), da Faculdade de
92 Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista, UNESP – Campus Botucatu.

93 A extração e purificação do DNA das amostras de cérebro foram realizadas usando o kit
94 comercial *Illustra Tissue and cells genomic Prep Mini spin kit* (GE Healthcare Life Sciences do
95 Brasil Ltda.[®]), de acordo com as instruções do fabricante. As reações em cadeia pela polimerase
96 (PCR) foram realizadas usando os oligonucleotídeos inicializadores descritos por Homan et al.
97 (2000), que amplificam um fragmento de 529pb, AF146527 [Genbank], repetido de 200- a 300-
98 vezes no genoma de *T. gondii*. Assim, os oligonucleotídeos TOX4
99 (5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3') e TOX5

100 (5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT3') foram usados. As PCR foram realizadas em
101 volumes de 25µL contendo 10pM de cada oligonucleotídeo (Prodimol, Brasil), tampão de PCR 10X
102 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, Invitrogen, São Paulo, SP), 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen), 1,25mM
103 dNTP (Invitrogen), 0,15U de *Taq* polymerase Platinum (Invitrogen), e água ultrapura q.s.p. As
104 ampliações foram realizadas em termociclador MasterCycler EP (Eppendorf, Brasil). Após
105 denaturação inicial a 94°C por sete minutos, seguiram-se 35 ciclos de 94°C por um minuto, 60°C
106 por um minuto e 72°C por um minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. As sequências
107 amplificadas foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado pelo brometo de
108 etídeo, com registro digital pelo Gel-Doc it system (UVP, USA), em computador específico.

109 A tipagem das cepas foi realizada usando-se 12 marcadores genéticos: SAG1, SAG2, SAG3,
110 BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3, como descrito previamente (Su et al., 2006;
111 Ferreira et al., 2006; Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008). Um marcador adicional foi incluído para
112 avaliar a virulência (Khan et al., 2009), as CS3 (Khan et al., 2005). Cepas de referência (GT1, PTG,
113 CTG, TgCgCa1, MAS e TgCatBr5) foram utilizadas como controle das reações. As sequências alvo
114 de DNA eram primeiramente amplificadas e, uma PCR *multiplex* usando os oligonucleotídeos
115 externos para todos os marcadores, seguido de *nested*-PCR para os marcadores individuais para
116 genotipagem como descrito previamente (Su et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Dubey et al., 2007;
117 Pena et al., 2008). Todos os produtos amplificados foram visualizados pela eletroforese em géis de
118 agarose a 1,5, 2,5 ou 3%, dependendo do marcador, corados com brometo de etídeo, e registrados
119 digitalmente pelo Gel-Doc it system (UVP, USA), em um computador específico.

120 3. Resultados

121 Foram capturados 43 roedores, sendo 44,2% *Mus musculus* e 55,8% *Rattus rattus*. Entre os
122 *M. musculus* 31,6% eram machos e 68,4% fêmeas, e para *R. rattus* 58,3% eram machos e 41,7%
123 fêmeas (Apendice 1: Figuras 1, 2 e 3).

124 Nenhum animal foi positivo ao MAT para detecção de anticorpos contra *Toxoplasma*.
125 Amostras de cérebro e coração (*pool*) obtidas de dois *M. musculus*, e quatro *R. rattus*, mesmo

126 negativas ao MAT, foram processadas individualmente para o isolamento em camundongos, sendo
127 inoculados cinco camundongos para cada um destes seis animais, num total de 30 animais. As
128 amostras dos 37 roedores restantes foram reunidas em *pools* de até cinco animais e cada *pool*
129 inoculado em cinco camundongos, totalizando 40 camundongos inoculados. Observados durante 60
130 dias, os camundongos inoculados não apresentaram alterações clínicas, e aos 61 dias pós-
131 inoculação, foi realizada a coleta de sangue destes animais, para detecção de anticorpos anti-*T.*
132 *gondii*. Dos 70 animais examinados, cinco foram positivos ao MAT à diluição 1:25 do soro. Destes
133 camundongos, três haviam sido inoculados com *pool* de cérebro e coração de um *M. musculus*
134 sinantrópico e outros dois inoculados com *pool* de cérebro e coração de um *R. rattus*. No macerado
135 do cérebro de um dos camundongos inoculados com amostra de *R. rattus* foi encontrado um cisto
136 tecidual de *T. gondii*. As amostras de cérebro destes animais soropositivos foram encaminhadas
137 para extração de DNA e genotipagem do *T. gondii*.

138 Isolou-se duas cepas de *T. gondii*, ambas já relatadas na literatura tendo sido denominadas
139 *TgCatBr5* e *TgCatBr10*, neste trabalho isoladas de um *M. musculus* e um *R. rattus*,
140 respectivamente. Estas cepas foram originalmente isoladas de gatos por Dubey et al (2004) no
141 Estado do Paraná, Brasil.

142 A partir destes resultados, os soros do *M. musculus* e do *R. rattus* foram reavaliados para a
143 presença de anticorpos contra *T. gondii* pelo MAT, a partir da diluição 1:2, e em diluições seriadas
144 na base 2 até 256, mas anticorpos não foram detectados mesmo nas diluições mais baixas, inclusive
145 quando avaliadas em outro laboratório (NUPEZO), utilizando lote de antígeno diferente do
146 inicialmente usado para avaliar as amostras dos roedores.

147 **4. Discussão**

148 Neste trabalho é relatado o isolamento e genotipagem de *T. gondii* de roedores sinantrópicos
149 urbanos no Estado do Paraná, Brasil. Não foram detectados anticorpos em nenhum dos 43 roedores
150 examinados.

151 No Brasil, Sogorb; Jamra; Guimarães (1977) pesquisaram a toxoplasmose em aves e
152 mamíferos do Estado de São Paulo, incluindo oito *R. norvegicus*, todos negativos, e quatro *R.*
153 *rattus*, sendo dois positivos para o teste de Sabin-Feldman. Ruffolo (2008; *unpublished data*)
154 pesquisou 182 roedores em Londrina – PR, destes, sete foram soropositivos para *T. gondii*.
155 Muradian et al. (2008; *unpublished data*) dos 217 roedores examinados na cidade de São Paulo,
156 apenas um foi positivo.

157 Quando considerada a literatura mundial, os dados de detecção de anticorpos em *Rattus*
158 variam enormemente, devido às diferenças regionais e com relação ao método utilizado. Em 58
159 estudos revisados por Dubey e Frenkel (1998), um total de 7549 roedores foram examinados, com
160 média de 130 animais por estudo, e 16,37% de animais sorologicamente reagentes. Em trabalhos
161 mais recentes, Murphy et al. (2008) pesquisaram 200 *Mus domesticus* na Inglaterra, e 59% foram
162 *Toxoplasma*-positivo. Salibay; Claveria (2006), pesquisaram casos de toxoplasmose crônica e aguda
163 em *R. norvegicus* e *R. rattus mindanensis* em áreas urbanas e rurais nas Filipinas, encontrando 58%
164 dos *R. norvegicus* e 42% dos *R. rattus mindanensis* com anticorpos contra *T. gondii*.

165 Do ponto de vista parasitológico, Dubey e Frenkel (1998) revisaram 39 trabalhos, revelando
166 o exame de 1909 animais, com média de 50 animais por trabalho e 2,36% de isolamentos. Muitos
167 fatores como a taxa de eliminação de oocistos pelos gatos no ambiente e o clima, podem afetar a
168 sobrevivência dos oocistos e influenciar as taxas de infecção pelo parasito em ratos. Hughes et al.
169 (2006) detectaram DNA de *T. gondii* em 53 dos 100 *Mus* examinados e em 19 dos 43 *Rattus*
170 avaliados.

171 Neste trabalho, *T. gondii* foi isolado de um *Mus musculus* e um *Rattus rattus*, soronegativos
172 ao MAT, mesmo quando o soro foi diluído a 1:2. O isolamento do parasito de animais
173 soronegativos já foi relatado em suínos (Dubey et al., 2002), galinhas (Dubey et al., 2005), 6 tatus-
174 cavalo (da Silva et al., 2006), em raposas árticas (Prestrud et al., 2008), e a detecção de DNA
175 específico do parasito de seis dos nove pardais (*Passer domesticus*) soronegativos para *T. gondii*
176 avaliados por Gondim et al (2010) dos Estados da Bahia e Pernambuco, Brasil. Em roedores, tal

177 comportamento já havia sido descrito por Eyles (1952), que isolou *T. gondii* em camundongos a
178 partir do cérebro de um *R. norvegicus* sorologicamente negativo, e verificado experimentalmente
179 em *R. norvegicus* por Dubey et al. (1997), onde, de 16 filhotes com cistos teciduais, oriundos de
180 ratas previamente infectadas, cinco foram negativos ao teste de Sabin-Feldman (<1:4) e ao MAT
181 (<1:20). Uma possível explicação para este comportamento é que roedores infectados pela via
182 congênita, expostos durante o início da vida uterina, não produziram uma resposta mensurável de
183 anticorpos (Murphy et al., 2008).

184 Apenas recentemente têm sido publicados dados sobre a genotipagem de cepas de *T. gondii*
185 de roedores sinantrópicos capturados em áreas urbanas. Messaritakis et al (2008) examinaram o
186 soro de 112 ratos para a detecção de anticorpos contra *T. gondii*, pela reação de imunofluorescência
187 indireta para anticorpos IgG, oriundos de Creta, Grécia. De dois ratos soropositivos, DNA foi
188 isolado do cérebro, resultando na detecção do parasito e posterior classificação como tipo III pela
189 análise do *locus* GRA6. No Estado do Paraná, Brasil, Ruffollo (2008; *unpublished data*) isolou
190 quatro amostras de *T. gondii* de *R. rattus* a partir do bioensaio do cérebro e fígado de dezesseis
191 animais soropositivos. As cepas isoladas, quando avaliado o *locus* SAG2, apresentaram-se ou como
192 tipo I, em uma cepa, ou combinação dos tipos I/III, em três cepas.

193 As cepas isoladas neste trabalho já haviam sido anteriormente detectadas, em gatos, por
194 Dubey et al. (2004), que fizeram a denominação das cepas. É interessante notar que o isolamento
195 original, em gatos, se deu no mesmo Estado onde este trabalho foi realizado, e em 2009, as mesmas
196 cepas foram isoladas de galinhas criadas extensivamente, oriundas de fazendas produtoras de suínos
197 na região de Toledo, PR (*unpublished data*).

198 Neste trabalho as cepas isoladas mostraram-se avirulentas para os camundongos inoculados,
199 que sobreviveram aos 60 dias de inoculação, tendo sido detectados apenas cistos teciduais (um
200 camundongo), anticorpos (cinco camundongos) ou DNA (cinco camundongos). Este resultado
201 contraria a expectativa gerada pelo resultado obtido para o marcador CS3 (perfil II), ou seja de
202 virulência para marcadores I ou II (Pena et al., 2008). No isolamento original destas cepas,

203 realizado pelo bioensaio em gatos, usando os tecidos de gatos naturalmente infectados, as cepas
204 mostraram-se virulentas para camundongos somente a partir de taquizoítos obtidos de infecções
205 com oocistos, não tendo sido isoladas em camundongos na inoculação original dos tecidos obtidos
206 dos gatos. Como apontado por Pena et al. (2008), a virulência do parasito em camundongos
207 depende de vários fatores, que incluem estágio parasitário, via de infecção, dose infectante,
208 linhagem do camundongo e a cepa do parasito (Dubey et al, 2004). Nas amostras das cepas
209 *TgCatBr5* e *TgCatBr10* isoladas de galinhas em Toledo, PR, em 2009 (*unpublished data*), houve
210 mortalidade de camundongos em uma de nove amostras *TgCatBr10* e em três de seis amostras
211 *TgCatBr5*, mas, houve correlação entre a dose infectante inicial, verificada pela *real-time PCR*, a
212 mortalidade e a perda de peso nos camundongos inoculados.

213 Os resultados deste trabalho permitem sugerir que a identificação da infecção pelo *T. gondii*
214 em amostras de roedores sinantrópicos deva ser examinada não somente pelos métodos de detecção
215 de anticorpos, mas também ou pela bioprova ou pela detecção de DNA do parasito nos tecidos,
216 inclusive nos animais soronegativos. Por outro lado, a genotipagem *multilocus* permitiu detectar em
217 roedores, cepas já verificadas em gatos e galinhas, confirmando a circulação desta cepa em diversas
218 espécies que participam do ciclo epidemiológico deste parasito.

219 **Conflito de interesses**

220 Nenhum.

221 **Agradecimentos**

222 Nós gostaríamos de agradecer à Universidade Paranaense (UNIPAR) pelas bolsas de estudo
223 (programas PIT e PIBIC) e pelo apoio financeiro (Processo nº 14707/2009).

224 **Referências**

225 Bevilacqua, P.; Carmo, R.F.; Silva, J.C.P.; Lessa, G. 2004. Roedores inventariados em hospital
226 veterinário e fragmento de mata nativa da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil: caracterização
227 populacional e infecção por *Leptospira* sp. *Ciência Rural*, 34, 1519-1523.

- 228 Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle de Roedores.
229 Brasília: FUNASA. 2002. 130p.
- 230 Childs, J.E., 1986. Size-dependent predation on rats *Rattus norvegicus* by house cats (*Felis catus*)
231 in an urban setting. J. Mammol. 67, 196–199.
- 232 Da Silva, A.V., Cutolo, A.A., Langoni, H.. 2006. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild
233 mammals Serological evidence in *Dasyprocta novemcinctus* Linnaeus 1758 and *Euphractus sexcinctus*
234 Wagler, 1830. Vet. Parasitol. 135, 81-83.
- 235 Desmonts, G., Remington, J.S., 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma*
236 infection: method for increasing sensitivity and specificity. Journal of Clinical Microbiology 11,
237 562-568.
- 238 Dubey, J.P., Shen, S.K., Kwok, O.C., Thulliez, P. 1997. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*):
239 congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii*
240 from seronegative rats. Parasitology, 115, 9-14.
- 241 Dubey, J.P., Gamble, H.R., Hill, D., Sreekumar, C., Romand, S., Thuilliez, P. 2002. High
242 prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in
243 Massachusetts. J Parasitol. 88, 1234-1238.
- 244 Dubey, J.P., Navarro, I.T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R.L., Kawabata, H.H., Vianna, M.C.,
245 Kwok, O.C., Shen, S.K., Thulliez, P., Lehmann, T. 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from
246 Paraná, Brazil: Seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of
247 isolates. J Parasitol. 96, 721-726.
- 248 Dubey, J.P., Su, C., Oliveira, J., Morales, J.A., Bolaños, R.V., Sundar, N., Kwok, O.C.H., Shen,
249 S.K.. 2005. Genetic and Biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range
250 chickens from Colombia, South America. Vet Parasitol. 134, 67-72.
- 251 Dubey, J.P.; Frenkel, J.K. 1998 Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value
252 as an animal model and their possible role in epidemiology. Vet Parasitol, 77, 1-32.

- 253 Dubey, J.P. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from
254 infected tissues. *Vet Parasitol*, 74, 75-77.
- 255 Dubey, J.P., Beattie, C.P. 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton,
256 220p.
- 257 Dubey, J.P., Sundar, N., Gennari, S.M., Minervino, A.H.H., Farias, N.A.D.R., Ruas, J.L., dos
258 Santos, T.R.B., Cavalcante, G.T., Kwok, O.C.H., Su, C., 2007. Biologic and genetic comparison of
259 *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern
260 state Rio Grande do Sul, Brasil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet.*
261 *Parasitol*. 143, 182–188.
- 262 Eyles, D.E., 1952. *Toxoplasma* in the Norway rat. *J Parasitol*, 38, 226–229.
- 263 Ferreira, A.M., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of natural
264 recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect., Genet. Evol.* 6,
265 22–31.
- 266 Gondim, L.S.Q., Abe-Sandes, K., Uzeda, R.S., Silva, M.S.A., Santos, S.L., Mota, R.A., Vilela,
267 S.M.O., Gondim, L.F.P. 2010. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer*
268 *domesticus*) in the northeast of Brazil. *Vet Parasitol*, 168, 121-124.
- 269 Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200-
270 to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and
271 quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69–75.
- 272 Hughes, J.M. 2006. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii*
273 by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitol.* 132, 29-36.
- 274 Khan, A., Taylor, S., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2009. Selection at a single locus
275 leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLOS Gen.*
276 5. doi:10.1371/journal.pgen.1000404.
- 277 Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A.J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tang, K., Paulsen, I.T.,
278 Berriman, M., Boothroyd, J.C., Pfefferkorn, E.R., Dubey, J.P., Ajioka, J.W., Roos, D.S., Wootton,

- 279 J.C., Sibley, L.D., 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three
280 archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nuc. Acids Res.* 33, 2980–2992.
- 281 Messaritakis, I., Detsika, M., Koliou, M., Sifakis, S., Antoniou, M. 2008. Prevalent genotypes of
282 *Toxoplasma gondii* in pregnant women and patients from Crete and Cyprus. *Am J Trop Med Hyg*, 79,
283 205-209.
- 284 Murphy, R.G., Williams, R.H., Hughes, J.M., Hide, G., Ford, N.J., Oldbury, D.J. 2008. The urban
285 house mouse (*Mus domesticus*) as a reservoir of infection for the human parasite *Toxoplasma*
286 *gondii*: an unrecognized public health issue? *Int J Environ Health Res*, 18, 177-185.
- 287 Murrell, K.D., Gamble, H.R., Schad, G.A. 1984. Experimental transmission of *Trichinella spiralis*
288 to swine by infected rats. *Proc Helminthol Soc Washington*, 51, 66–68.
- 289 Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of
290 *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569.
- 291 Prestud, K.W., Asbakk, K., Mork, T., Fuglei, E., Tryland, M., Su, C. 2008. Direct high-resolution
292 genotyping of *Toxoplasma gondii* in arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in the remote arctic Svalbard
293 archipelago reveal widespread clonal Type II lineage. *Vet Parasitol.* 158, 121-128.
- 294 Querino, A.M.V., Delbem, A.C.B., Oliveira, R.C., Silva, F.G., Muller, E.E., Freire, R.L., Freitas,
295 J.C. 2003. Risk factors associated to leptospirosis in dogs in Londrina City – PR. *Semina: Ciências*
296 *Agrárias*, 24, 27-34
- 297 Salibay, C.C., Claveria, F.G. 2005. Serologic detection of *Toxoplasma gondii* infection in *Rattus*
298 spp collected from three different sites in Dasmariñas, Cavite, Philippines. *Southeast Asian J Trop*
299 *Med Publ Health*, 36, 46-49.
- 300 Sogorb, F., Jamra, L.F., Guimaraes, E. C. 1977. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil.
301 *Rev Bras Med Trop São Paulo*, 19, 191-194.
- 302 Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP
303 markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 36,
304 841–848.

Avaliação da detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo método de aglutinação direta em tecidos de camundongos experimentalmente infectados.

Evaluation of anti-*Toxoplasma* antibody detection by modified agglutination test in tissue of experimentally infected mice.

Jacqueline Batista de Araújo¹, Aristeu Vieira da Silva^{2*}, Roger Estevam Soares³

¹ Mestrado em Ciência Animal, bolsista PIT/UNIPAR, Universidade Paranaense, Campus Umuarama, jacqueline@unipar.br

² Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense, Campus Umuarama, aristeuvsilva@gmail.com

³ Curso de Medicina Veterinária, bolsista PEBIC/CNPq, Universidade Paranaense, rogerestevam.soares@hotmail.com

ARAÚJO, J.B.; DA SILVA, A.V.; SOARES, R.E. Avaliação da detecção de anticorpos pelo método de aglutinação direta anti-*Toxoplasma gondii* em tecidos de camundongos experimentalmente infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.x, n. x, p.xx, 2010.

Abstract

Toxoplasma gondii infection affects homoeothermic animals around the world, and many infections, in animals and man, can result in abortion, congenital disorders, and ocular or neuromuscular disease, with serious impact in animal health. A variety of antibody detection methods have been proposed since initial description of Sabin-Feldman dye test, usually using blood sera as sample for detection. Tissues and fetal liquids can be used for antibody research too, but few researches compare the performance of this detection in parwise sera, and the evaluation of autolysis effect was not been verified. This work shows the results of sensibility, specificity and the efficiency of método de aglutinação direta anti-*T. gondii* antibody detection in fresh or autolysed samples of liver, spleen and muscle, obtained of chronically infected mice.

Key-words: *Toxoplasma*; modified agglutination method; tissues; ROC curves.

* **Autor para correspondência:** Aristeu Vieira da Silva
Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense, UNIPAR, Campus Umuarama
Praça Mascarenhas de Moraes, 4282 CEP 87502-210 Umuarama – PR, Brasil
E-mail: aristeuvsilva@gmail.com

Resumo

A infecção pelo *Toxoplasma gondii* afeta animais homeotérmicos em todo o mundo, e muitas infecções, nos animais e no homem, podem resultar em abortamentos, alterações congênicas e doença ocular ou neuromuscular, com sérios impactos em saúde animal e saúde pública. Diversos testes de detecção de anticorpos têm sido propostos desde a descrição inicial do teste de Sabin-Feldman, usualmente utilizando o soro sanguíneo como amostra para a detecção. Tecidos e líquidos fetais também podem ser utilizados para a pesquisa de anticorpos, entretanto poucos trabalhos comparam o desempenho desta detecção em amostras pareadas com soro sanguíneo, e a avaliação do efeito da autólise não foi verificada. Este trabalho apresenta os resultados de sensibilidade, especificidade e a eficiência do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de fígado, baço e musculatura, recém coletadas, ou autolisadas, oriundas de camundongos cronicamente infectados.

Palavras-chave: *Toxoplasma*; método de aglutinação direta; tecidos; curvas ROC.

Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pelo parasito intracelular *Toxoplasma gondii*. A frequência em que a infecção por este parasito ocorre é variável nas regiões do planeta e está ligada a fatores como padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade, procedência rural ou urbana, entre outros (TENTER et al, 1999).

O *T. gondii* pode ser isolado de tecidos pela inoculação de animais de laboratório, principalmente camundongos e células em cultivo de tecidos; entretanto, o isolamento pode ser difícil, dependendo das condições do tecido e da quantidade de amostra, além de, principalmente quando da utilização de animais, consumir um tempo variado de 20 a 60 dias para um diagnóstico final, e mesmo, exigir inoculações sucessivas do material. Tecidos podem ser examinados para a presença de *T. gondii* por técnicas citológicas e histopatológicas, entretanto, dependendo do estágio da infecção, o encontro do parasito pode ser tornar difícil, devido à distribuição irregular dos cistos teciduais nos órgãos e mesmo em um determinado órgão (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Dada as limitações da detecção direta do parasito, a alternativa mais frequente para a detecção da infecção é a pesquisa de anticorpos séricos. O primeiro teste de detecção de anticorpos foi o do corante de Sabin-Feldman (DUBEY, 2007), que foi

seguido por outros métodos, tais como a imunofluorescência indireta e o teste de aglutinação direta (DUBEY e BEATTIE, 1988). Classicamente estes testes utilizam soro sanguíneo como amostra para a detecção de anticorpos. Entretanto em algumas situações, a obtenção de soro sanguíneo pode ser difícil, e a detecção de anticorpos e outros marcadores séricos pode ser impossibilitada (PIÑEIRO et al., 2009). Amostras de tecidos provenientes de abatedouros, ou de animais encontrados mortos, bem como fluidos de fetos abortados, podem ser uma alternativa para a detecção da presença de anticorpos.

No Japão, Hagiwara; Katsube (1981) detectaram correlação significativa ($r=0,82$) nos títulos de anticorpos, determinados pela reação de Sabin-Feldman, em 190 amostras de soro de suínos examinadas de forma pareada com suspensões de musculatura.

Arthur; Blewett (1988) examinaram fluidos fetais de 171 cordeiros abortados, a fim de detectar anticorpos anti-*T. gondii* pela RIFI para anticorpos da classe IgG. O grau de deterioração das amostras examinadas não influenciou os resultados para este método, obtendo-se 28 amostras soropositivas com diluições maiores que dois. Segundo os autores, a detecção de anticorpos fetais específicos para *T. gondii* pela RIFI oferece um meio rápido e confiável de diagnóstico da infecção por este parasito.

Fluidos torácicos fetais de 738 suínos abortados na Argentina foram examinados para detecção de anticorpos contra *T. gondii* pelos métodos de imunofluorescência indireta (RIFI) e aglutinação direta (MAD). Destes, 15 animais apresentaram anticorpos contra *T. gondii* no primeiro método e dez foram soropositivos para o segundo (VENTURINI, et al., 1999).

A prevalência da infecção por *T. gondii* foi investigada por análise de 807 amostras de suspensão de musculatura coletadas de dez abatedouros de suínos por Lundén et al. (2002), que utilizaram para o diagnóstico o ensaio imunoenzimático (ELISA), encontrando 42 (5,2%) amostras positivas.

A despeito de serem utilizadas como amostras para a pesquisa de anticorpos, tecidos e líquidos fetais de animais infectados não foram sistematicamente testados quanto a sua performance na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* pelo método de aglutinação direta, comparando-se com provas padronizadas, tais como a detecção de anticorpos no soro sanguíneo ou de cistos teciduais nos tecidos. O presente trabalho tem como objetivo comparar a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* pelo método de aglutinação direta em amostras de fígado, baço e musculatura de camundongos

cronicamente infectados, com a detecção de anticorpos em amostras de soro dos mesmos animais, bem como verificar a influência da autólise na performance da detecção de anticorpos em tecidos.

Material e Métodos

Foram utilizados 32 camundongos infectados e não infectados, mantidos no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da Universidade Paranaense (LMVP/UNIPAR).

Para a avaliação do teste de aglutinação direta (MAD) na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em tecidos de camundongos cronicamente infectados foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro com tecidos coletados de animais logo após a eutanásia, enquanto que o segundo com tecidos coletados de animais às 24, 48, 72 e 96 horas após a eutanásia, para se avaliar os parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste em tecidos autolisados.

Experimento I

Animais

Foram examinados camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* (LMVP/UNIPAR), Campus Umuarama, para manutenção de duas cepas do parasito, denominadas ME-49 e UMU-01. Foi coletado o sangue, para obtenção de soro sanguíneo e outros órgãos, para preparação das suspensões dos mesmos, destes camundongos, que fizeram parte dos grupos experimentais positivos. Como grupo controle negativo foram utilizados camundongos de descarte obtidos junto ao Biotério da UNIPAR Campus Cruzeiro.

Grupos experimentais

Camundongos cronicamente infectados com o parasito foram anestesiados em câmara saturada de vapor de halotano, para coleta de sangue e em seguida sofreram eutanásia para coleta dos órgãos. Da mesma forma coletadas amostras de animais negativos a presença de *T. gondii*, constituindo-se o grupo controle negativo.

Coleta das amostras

O sangue dos animais foi coletado pela punção do seio retro-orbitário com capilar de vidro e transferido para microtubos plásticos, devidamente identificados por um número de protocolo. Após a coleta as amostras de sangue foram centrifugadas a 1650 g por 15 minutos para promover a dessora, e alíquotas de 0,5 ml de soro foram armazenadas a -20°C, até o exame para detecção de anticorpos.

Os camundongos sofreram eutanásia pelo aprofundamento anestésico. A seguir os animais foram fixados em placa de isopor, em decúbito dorsal, para incisão do abdômen e exposição da cavidade abdominal para coleta do fígado e do baço, e dissecados de forma a se coletar amostras de musculatura, principalmente dos membros torácicos e pélvicos. Tais amostras após pesadas, trituradas em gral de cerâmica com pistilo e adicionado igual volume de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF), pH 7,2, para suspensão do tecido, foram centrifugadas a 1650 g por 15 minutos, e alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante armazenadas em microtubos plásticos devidamente identificados, e congeladas a -20°C, até proceder-se o exame para detecção de anticorpos nas mesmas.

Exame de detecção de anticorpos

Para o exame das amostras de soro e de suspensão de órgãos foi usado o método de aglutinação direta para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* usando antígeno fixados pela formalina – MAD-AF (DEMONSTS; REMINGTON, 1980), preparado no LMVP/UNIPAR. Inicialmente foi realizada diluição das amostras a 1:2 em SSTF, seguida de diluições seriadas na base dois para determinação do título de anticorpos nas amostras.

Experimento II

O experimento II seguiu o mesmo protocolo para coleta e preparação das amostras e para o exame de detecção de anticorpos, entretanto foram constituídos quatro grupos de amostras provenientes de cinco camundongos cronicamente infectados, e quatro grupos de amostras de três camundongos não infectados, totalizando 32 animais avaliados. As amostras de soro foram coletadas com os animais anestesiados, mas as amostras de tecidos (baço, fígado e musculatura) apenas às 24, 48, 72 e 96 horas após a

eutanásia. Durante estes períodos as carcaças dos animais foram mantidas a temperatura ambiente ($22,5^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$), em caixas protegidas do contato com moscas.

Análise dos dados

Para o experimento I, a associação entre os resultados da detecção de anticorpos no soro e nas suspensões de tecidos foi verificada pelo teste de McNemar, cálculo do índice de associação kappa, e dos índices de sensibilidade, especificidade, taxa de falso-positivos, taxa de falso-negativos, e concordância dos testes (MACKINNON, 2000). Além disso, foi determinada a curva *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*) e a área da curva para comparação da qualidade diagnóstica da detecção de anticorpos em cada um dos tecidos avaliados, tendo como padrão-ouro a detecção de anticorpos no soro (ZHOU et al., 2002; GARDNER et al, 2009). Para o experimento II, foi calculada a sensibilidade e especificidade para cada tecido avaliado, independente do tempo de autólise, e os tecidos comparados entre si pela determinação da curva *ROC* e da área associada. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significantes.

Resultados e Discussão

Entre os camundongos cronicamente infectados e não infectados, avaliados no Experimento I, foram examinadas 70 amostras de soro, fígado e baço, e 69 amostras de musculatura, correspondendo ao Experimento I. As associações dos resultados do método de aglutinação direta entre soro, fígado, baço e músculo são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Associação dos resultados do método de aglutinação direta (MAD) na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soro, fígado, baço e músculo de camundongos cronicamente infectados ou não.

| | Fígado ¹ | | Baço ² | | Músculo ³ | | |
|-------|---------------------|----------|-------------------|----------|----------------------|----------|----|
| | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | |
| Soro | Positivo | 30 | 4 | 31 | 3 | 25 | 8 |
| | Negativo | 4 | 32 | 2 | 34 | 0 | 36 |
| Total | 34 | 36 | 33 | 37 | 25 | 44 | |

Estatística: Teste do χ^2 de McNemar - ¹ $\chi^2=0,13$ (p=0,7237); ² $\chi^2=6,13$ (p=0,0133); ³ $\chi^2=0,00$ (p=1,0000).

Das amostras comparadas ao padrão-ouro para o método de aglutinação direta, as de fígado apresentaram 30 resultados verdadeiros positivos, 32 verdadeiros negativos

e quatro falsos positivos e falsos negativos. Das 69 amostras de musculatura, 25 apresentaram resultados verdadeiros positivos, 36 verdadeiros negativos, oito falsos positivos e nenhum falso negativo. Enquanto com as amostras de baço obteve-se 31 verdadeiros positivos, 34 verdadeiros negativos, três falsos positivos e dois falsos negativos. Entre as amostras avaliadas, o músculo obteve menor sensibilidade ($75,8 \pm 7,4\%$), com 24,4 % de chance de apresentar resultado falso positivo. Porém, apresentou 100 % de especificidade, o maior resultado para detecção de verdadeiros negativos, com eficiência de $88,4 \pm 3,8\%$ (Tabela 2).

Tabela 2. Estatísticas de validação (E - % da estimativa \pm dp - desvio-padrão da estimativa; IC95% - intervalo de confiança 95%) dos resultados de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo método de aglutinação direta em suspensão de fígado, baço e músculo de camundongos cronicamente infectados. Umuarama -2010.

| Estatística | Fígado | | Baço | | Músculo | |
|----------------|----------------|-----------|----------------|-----------|-----------------|------------|
| | E \pm dp | IC95% | E \pm dp | IC95% | E \pm dp | IC95% |
| Sensibilidade | 88,2 \pm 5,5 | 72,6-96,7 | 91,2 \pm 4,9 | 76,3-98,1 | 75,8 \pm 7,5 | 57,7-88,9 |
| Especificidade | 88,9 \pm 5,2 | 73,9-96,9 | 94,4 \pm 3,8 | 81,3-99,3 | 100,0 \pm 0,0 | 90,3-ND |
| Eficiência | 88,6 \pm 3,8 | 78,7-94,9 | 92,9 \pm 3,1 | 84,1-97,6 | 88,4 \pm 3,8 | 78,4-94,9 |
| VPP | 88,2 \pm 5,5 | 72,6-96,7 | 93,9 \pm 4,2 | 79,8-99,3 | 100,0 \pm 0,0 | 86,3-ND |
| VPN | 88,9 \pm 5,2 | 73,9-96,9 | 91,9 \pm 4,5 | 78,1-98,3 | 81,8 \pm 5,8 | 67,3-91,8 |
| Falso positivo | 11,1 \pm 5,2 | 3,1-26,1 | 5,6 \pm 3,8 | 0,7-18,7 | 0,0 \pm 0,0 | ND-9,7 |
| Falso negativo | 11,8 \pm 5,5 | 3,3-27,4 | 8,8 \pm 4,9 | 1,9-23,7 | 24,2 \pm 7,5 | 11,1-42,3 |
| kappa | 77,1 \pm 7,6 | 62,2-92,0 | 85,7 \pm 6,2 | 73,6-97,8 | 76,5 \pm 7,6 | 61,7- 91,4 |

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; IC = intervalo de confiança 95%; ND = não definido.

Quando verificada as curvas *ROC* e as áreas associadas, entretanto, não se verificou diferença na eficiência entre tecidos (Tabela 3, Figura 1) na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* ($p < 0,05$).

Tabela 3. Diferenças na área sobre a curva *ROC* (ΔAUC), intervalo de confiança 95% (IC95%) e valor de P para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo método de aglutinação direta em suspensões de amostras de fígado, baço e músculo de camundongos cronicamente infectados.

| Amostras pareadas | ΔAUC | IC95% | Valor de P |
|-------------------|--------------|----------------|------------|
| Fígado – Baço | 0,033 | -0,062 – 0,128 | 0,500 |
| Fígado – Músculo | 0,002 | -0,102 – 0,107 | 0,962 |
| Baço – Músculo | 0,030 | -0,043 – 0,103 | 0,417 |

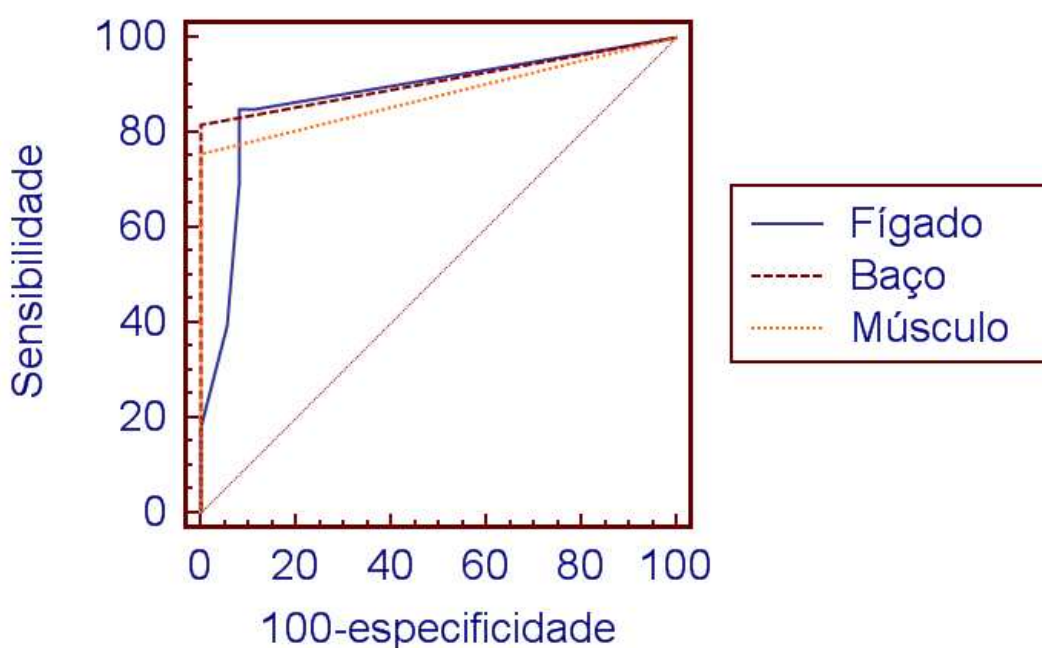


Figura 1. Curva *ROC* para os resultados de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suspensões de fígado, baço e músculo de camundongos cronicamente infectados.

Como em outros trabalhos de detecção de anticorpos em suspensões de musculatura, a sensibilidade do MAD foi menor. Lundén et al. (2002) encontraram sensibilidade de 94% e especificidade de 92% quando compararam o ELISA em suspensão de músculo aos resultados da reação de Sabin-Feldman no soro de animais naturalmente infectados. Hill et al. (2006), também comparando o ELISA em suspensões de musculatura de animais experimentalmente infectados, encontraram sensibilidade de 76,9%, enquanto que o MAD do soro apresentou 80,6% de sensibilidade e o ELISA no soro, 100%. Por outro lado, apesar da menor sensibilidade,

a especificidade foi de 100% neste trabalho, e Hill et al. (2006) encontraram valor preditivo negativo de 100% para o ELISA em suspensões de musculatura.

O experimento II procurou verificar a influência da autólise na performance da detecção de anticorpos nas amostras de tecidos de camundongos cronicamente infectados. Não houve diferenças, independente do tecido avaliado, na performance da MAD nos diferentes momentos de coleta de amostras (24, 48, 72 ou 96 horas; $p > 0,05$), e com isso, para análise final, os resultados, independente dos momentos de coleta, foram considerados em conjunto, para cada um dos tecidos.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros de sensibilidade e especificidade da detecção de anticorpos pelo MAD, para cada um dos tecidos, quando o critério de validação foram os títulos >0 , >2 e >20 . Como pode ser verificado, independente do título e tecido considerado houve diminuição expressiva dos parâmetros. O tecido menos afetado foi a musculatura, seja na sensibilidade seja na especificidade, e quando considerados títulos maiores que 2, foi o tecido com melhor performance (Figura 2).

Tabela 4. Sensibilidade (SE) e especificidade (ES) - % da estimativa e IC95% - intervalo de confiança 95% - dos resultados de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo método de aglutinação direta em suspensão de fígado, baço e músculo de camundongos cronicamente infectados, em amostras coletadas entre 24 a 96 horas após a eutanásia.

| Tecido | Parâmetro | Critério (título de anticorpos) | | | | | |
|---------|-----------|---------------------------------|------------|-------|-----------|--------|------------|
| | | >0 | | >2 | | >20 | |
| | | % | IC95 | % | IC95 | % | IC95 |
| Fígado | SE | 90,0 | 68,3-98,8 | 25,00 | 8,7-49,1 | 5,00 | 0,1-24,9 |
| | ES | 66,7 | 34,9-90,1 | 91,67 | 61,5-99,8 | 100,00 | 73,5-100,0 |
| Baço | SE | 100,0 | 83,2-100,0 | 50,00 | 27,2-72,8 | 25,00 | 8,7-49,1 |
| | ES | 41,7 | 15,2-72,3 | 83,33 | 51,6-97,9 | 100,00 | 73,5-100,0 |
| Músculo | SE | 90,0 | 68,3-98,8 | 70,00 | 45,7-88,1 | 45,00 | 23,1-68,5 |
| | ES | 75,0 | 42,8-94,5 | 91,67 | 61,5-99,8 | 100,00 | 73,5-100,0 |

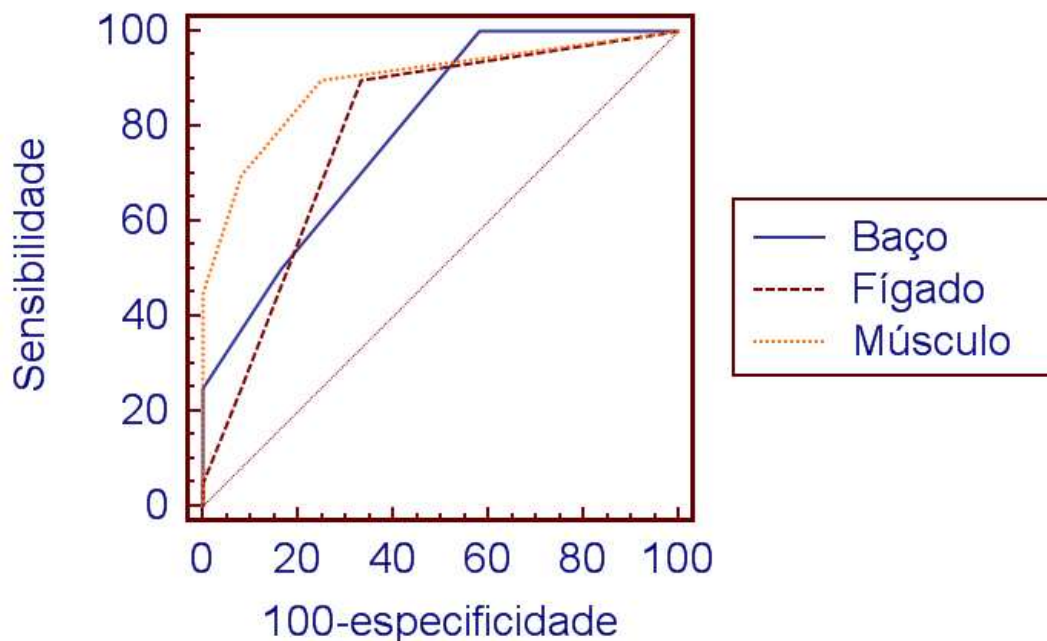


Figura 2. Curva ROC para os resultados de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suspensões de fígado, baço e músculo de camundongos cronicamente infectados, em amostras coletadas entre 24 a 96 horas após a eutanásia.

A Tabela 5 demonstra que, mesmo com as diferenças entre sensibilidade e especificidade, estas não foram suficientes para indicar diferença significativa entre os tecidos na detecção de anticorpos em amostras autolisadas.

Tabela 5. Diferenças na área sobre a curva ROC (ΔAUC), intervalo de confiança 95% (IC95%) e valor de P para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo método de aglutinação direta em suspensões de amostras de fígado, baço e músculo de camundongos cronicamente infectados, em amostras coletadas entre 24 a 96 horas após a eutanásia.

| Amostras pareadas | ΔAUC | IC95% | Valor de P |
|-------------------|--------------|----------------|------------|
| Fígado – Baço | 0,002 | -0,243 – 0,248 | 0,987 |
| Fígado – Músculo | 0,102 | -0,065 – 0,269 | 0,231 |
| Baço – Músculo | 0,104 | -0,088 – 0,296 | 0,287 |

A literatura não apresenta resultados de detecção de anticorpos em amostras de tecidos autolisados. Porém, uma fonte para a pesquisa de anticorpos, potencialmente alterada pelos fenômenos cadavéricos, são as amostras de fluidos fetais obtidas em casos de abortamento. Arthur; Blewett (1988) relatam que apenas títulos de anticorpos

acima de 256 poderiam ser considerados sensíveis e específicos para amostras de fluido torácico obtidos de cordeiros abortados; títulos menores que oito não estiveram associados a lesões histopatológicas de cotilédones fetais compatíveis com toxoplasmose. Venturini et al. (1999) verificaram diferença na detecção de anticorpos em fluidos fetais de suínos quando utilizando a RIFI e o MAD, sendo a primeira mais sensível. Neste caso os autores incriminaram a contaminação das amostras como um provável fator para a performance diminuída do método de aglutinação.

Apesar da perda de sensibilidade, principalmente quando avaliadas em amostras de fígado e baço, a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de tecidos pode ser indicada quando o soro sanguíneo não estiver disponível. Independente da queda de performance do teste de aglutinação nas amostras alteradas, a vantagem do método em prescindir de reagentes espécie-específicos pode justificar sua utilização principalmente quando estiverem envolvidos animais selvagens.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Iniciação Científica (Programa PEBIC CNPq/UNIPAR) e à Universidade Paranaense pelo auxílio à pesquisa na forma de bolsas de Treinamento Técnico-Científico (PIT/UNIPAR).

Referências bibliográficas

ARTHUR, M.J.; BLEWETT, D.A. IFAT detection of IgG specific to toxoplasma in thoracic fluids from aborted lambs: evaluation on routine diagnostic submissions. **The Veterinary Record**, v.122, p. 29-31, 1988.

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

DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animal and man**. Boca Ratón: CRC Press. 1988. 220p.

DUBEY, J.P. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In WEISS, L., KIM, K. **Toxoplasmosis**. New York: Academic Press. 2007. p.1-21

GARDNER, I.A.; GREINER, M.; DUBEY, J.P. Statistical evaluation of test accuracy studies for *Toxoplasma gondii* in food animal intermediate hosts. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, 82-94, 2010.

HAGIWARA, T.; KATSUBE, Y. Detection of *Toxoplasma* infection in Pork by Sabin-Feldman's dye test with meat extract. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.43, n, p.763-765, 1981.

HILL, D.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K.; GAMBLE, H.R. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. **Veterinary Parasitology**, v.141, p. 9-17, 2006

LUNDÉN, A.; LIND, P.; ENGVALL, E.O.; GUSTAVSSON, K.; UGGLA, A.; VANGSHOLM, I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, v.34, p. 362-365, 2002.

MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Computers in Biology and Medicine**, v.30, p.127-134, 2000.

PINEIRO, M. GYMNICH, S.; KNURA, S.; PINEIRO, C.; PETERSEN, B. Meat juice: an alternative matrix for assessing animal health by measuring acute phase proteins. Correlations of pig-MAP and haptoglobin. **Research in Veterinary Science**, v. 87, 273-276, 2009.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1217-1251, 2000.

VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; MACHUCA, M.; PERFUMO, C.J.; DUBEY, J.P. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stillborn piglets in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.85, p. 331-334, 1999.

WINGSTRAND, A.; LIND, P.; HAUGEGAARD, J.; HENRIKSEN, Sv.Aa.; BILLE-HANSEN, V.; SORENSEN, V. Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.72, p.129-140, 1997.

ZHOU, X-H.; OBUCHOWSKI, N.A.; McCLISH, D.K. **Statistical Methods in Diagnostic Medicine**. New York: Wiley-Interscience, 2002. 437p.

Apêndice 1: Figuras

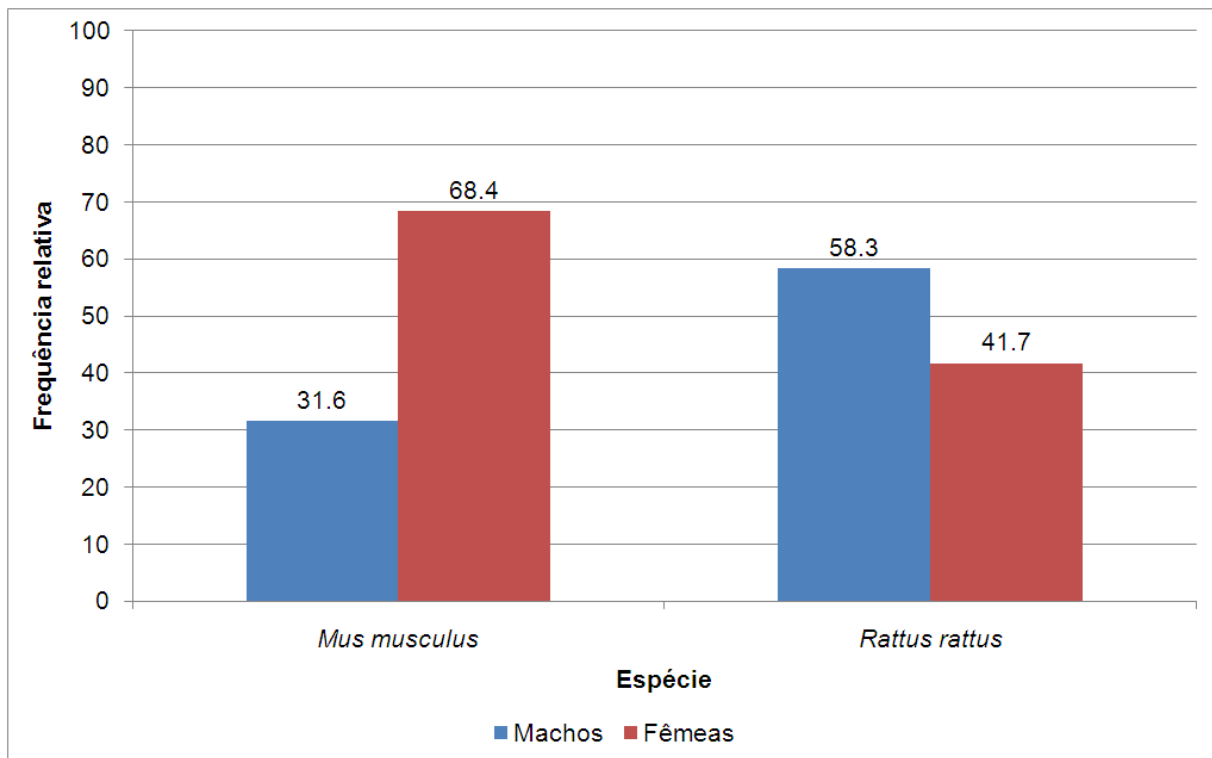


Figura 1. Frequência relativa de roedores sinantrópicos, segundo a espécie e sexo. Umuarama, 2009.

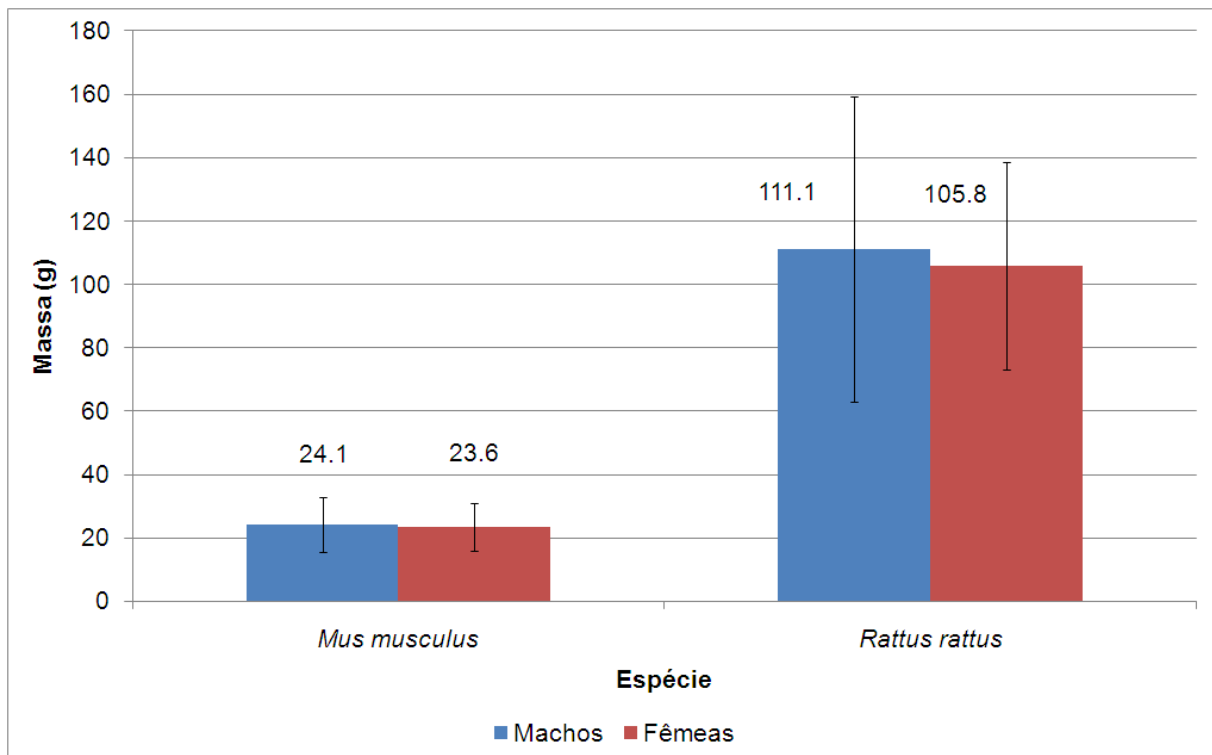


Figura 2. Massa corporal de roedores sinantrópicos segundo a espécie e sexo. Umuarama, 2009.

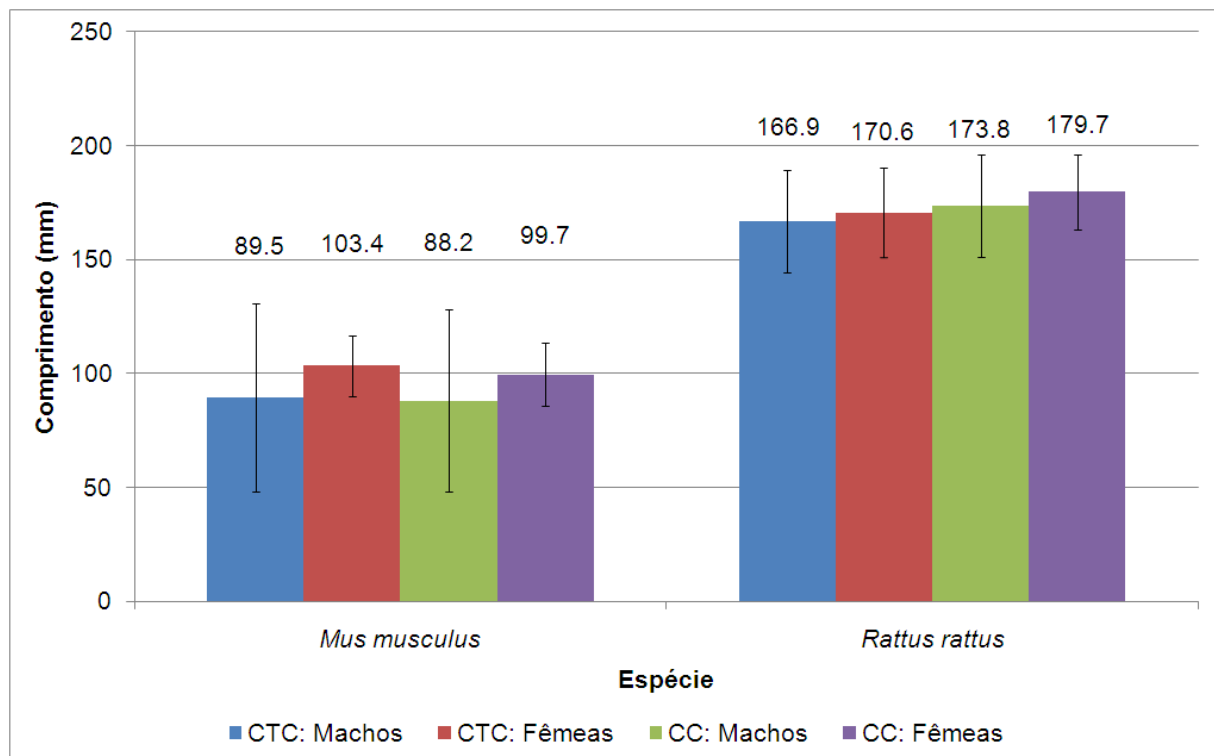


Figura 3. Comprimento total do corpo (CTC) e comprimento da cauda (CC) de roedores sinantrópicos segundo a espécie e sexo. Umuarama, 2009.

**Anexo 1: Certificados do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação
Animal**



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC

*DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC*



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "ROEDORES SINANTRÓPICOS COMO RESERVATÓRIOS DE AGENTES DE ZOONOSES: 1. TOXOPLASMA GONDII", protocolo 14707/2009, sob a responsabilidade de ARISTEU VIEIRA DA SILVA, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 29/08/2008. Este certificado expira em 29/08/2009.

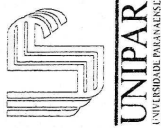
We certify that the project "ROEDORES SINANTRÓPICOS COMO RESERVATÓRIOS DE AGENTES DE ZOONOSES: 1. TOXOPLASMA GONDII", protocol 14707/2009, in the responsibility of ARISTEU VIEIRA DA SILVA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 08/29/2008. Expiration date: 08/29/2009.

UMUARAMA - PR, 20/11/2008.

Prof.ª Msc. Juliana Silveira do Valle
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº: 14707

Dayane Aparecida Fagiolo
Secretária CEPEEA/UNIPAR



UNIVERSIDADE PARANAENSE -- UNIPAR

Reconhecida pela Portaria – MEC N.º 1580, de 09/11/93 – D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura -- APEC

DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS-GRADUAÇÃO - DEGPP

COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA – COPIC

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)



DEGPP
DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS-GRADUAÇÃO

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto “DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Toxoplasma gondii EM AMOSTRAS DE TECIDOS DE CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFECTADOS”, protocolo 1013/2008, sob a responsabilidade de Aristeu Vieira da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR)** em reunião realizada em 31/07/2008.

We certify that the project “DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Toxoplasma gondii EM AMOSTRAS DE TECIDOS DE CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFECTADOS”, protocol 1013/2008, in the responsibility of Aristeu Vieira da Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the **ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR)** in 07/31/2008.

Prof.ª Dr.ª Juliana Silveira do Valle
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Dayane Aparecida Fagiolo
Secretária CEPEEA/UNIPAR

Umuarama, PR 04/08/2008.

Anexo 2: Norma do periódico *Veterinary Parasitology* (ISSN 0304-4017)

ELSEVIER

- [Home](#)
- [Products](#)
- [Alerts](#)
- [User Resources](#)
- [About Us](#)
- [Support & Contact](#)
- [Elsevier Websites](#)

[Advanced Product Search](#)

[Browse Journals](#) > [Veterinary Parasitology](#) > [Guide For Authors](#)

Veterinary Parasitology

An international scientific journal and the Official Organ of the [American Association of Veterinary Parasitologists \(AAVP\)](#), the [European Veterinary Parasitology College \(EVPC\)](#) and the [World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology \(WAAVP\)](#).



ISSN: 0304-4017

Imprint: ELSEVIER

Actions

-  [Submit Article](#)
-  [Order Journal](#)
-  [Free Sample Issue](#)
-  [Recommend to Friend](#)
-  [Bookmark this Page](#)

Statistics

Impact Factor: 2.039

Issues per year: 32

Additional Information

- [Related Publications](#)
- [Editorial Board](#)
-  [Login to Editorial System](#)
-  [Elsevier's Animal and Veterinary subject page](#)

Readers

- [Order Journal](#)
-  [Access Full-Text](#)
-  [Free Sample Issue](#)
-  [Volume/Issue Alert](#)
- [Free Tables of contents and abstracts](#)

Authors

<http://www.elsevier.com/locate/veterinary-parasitology>

18/2/2010

- [Authors Home](#)
- [Submit an Article](#)
- [Track Your Accepted Articles](#)
- [Guide for Authors](#)
- [Artwork instructions](#)
- [Authors Rights](#)
- [Funding Bodies Compliance](#)

Librarians

- [Librarians Home](#)
- [Ordering Information and Dispatch Dates](#)
- [Abstracting/Indexing](#)

Editors

- [Editors Home](#)
- [Article Tracking for Editors](#)
- [Ethics Questions \(PERK\)](#)

Reviewers

- [Reviewers Home](#)

Advertisers/Sponsors

- [Advertisers Home](#)
- [Reprints Information](#)



[Printer-friendly](#)

Guide for Authors

An international scientific journal and the Official Organ of the [American Association of Veterinary Parasitologists \(AAVP\)](#), the [European Veterinary Parasitology College \(EVPC\)](#) and the [World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology \(WAAVP\)](#).

Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Dr F.H.M. Borgsteede
Animal Sciences Group, Wageningen UR
Division Infectious Diseases

Laboratory of Parasitic Diseases
P.O. Box 65
8200 AB Lelystad
The Netherlands

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - ➡ <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: ➡ http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to *Veterinary Parasitology* who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions ➡ <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)
Name(s) of author(s)
Complete postal address(es) of affiliations
Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable
 Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent
 Abstract
 Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).
 Introduction
 Material studied, area descriptions, methods, techniques
 Results
 Discussion
 Conclusion
 Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.
 References
 Tables
 Figure captions
 Tables (separate file(s))
 Figures (separate file(s)).
 4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.
 5. SI units should be used.
 6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.
Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should

be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruyse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. *For books*

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. *For multi-author books*

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage ⇨ <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemregs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetpar>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Veterinary Parasitology has no page charges

This is a spacer...

[↑ Top of Page](#)

 [Printer-friendly version](#)



[ELSEVIER Home](#) | [Elsevier Sites](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [Feedback](#) | [Site Map](#) | [A Reed Elsevier Company](#)

Copyright © 2010 [Elsevier B.V.](#) All rights reserved.

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503321/authorinstructions

18/2/2010

Anexo 3: Norma do periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (ISSN 0103-846X)

Instruções aos Autores

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária
Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

Apresentação

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária.

Nesta revista, são abordados temas relativos a Helmintos, Protozoários e Artrópodes bem como assuntos correlatos.

O periódico publica suas pesquisas regularmente a cada três meses.

Política Editorial

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia deverão caracterizar-se como científicos e originais.

O(s) autor(es) deverá(ão) anexar uma carta, previamente assinada, responsabilizando-se pela originalidade do artigo (não publicados anteriormente), salvo Resumo(s) apresentado(s) em Eventos Científicos.

Trabalhos com mais de uma autoria deverão seguir com uma declaração de concordância de todos os autores, referente à publicação.

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator ad hoc. Neste processo, o Editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos no mesmo.

A Revista Brasileira de Parasitologia atribui a seus artigos as categorias de: Artigos Completos, Notas de Pesquisa e Artigos de Revisão, sendo este último condicionado a solicitação do corpo editorial.

Taxa de Tramitação

Da submissão do artigo, será cobrada uma taxa de R\$ 40,00 (quarenta reais) referente ao processo de tramitação.

Para início do processo de avaliação do trabalho, será observado o pagamento da taxa de tramitação estipulada acima, através de depósito bancário: Banco do Brasil/ Conta Corrente: 28.848-9/ Agência: 0269-0, cuja cópia de comprovante deverá ser enviada junto ao trabalho a ser submetido.

Taxa de Publicação

Para artigos aceitos, será cobrado, além da taxa de tramitação, o valor de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página impressa, referente à publicação. O valor total dessa taxa (dependerá do número de páginas do trabalho) será informado aos autores quando o processo de editoração for finalizado.

Da exceção

Ficará isento do pagamento da taxa de publicação aquele artigo em que pelo menos um dos autores for associado ao Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, porém em dia com a anuidade. Do autor responsável será cobrado o valor da revisão da língua portuguesa e da língua inglesa, referente ao trabalho aceito para publicação.

Apresentação dos Manuscritos

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

- Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte Times New Roman, tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas.
- Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 15 páginas.

- Para a categoria Notas de Pesquisa, o trabalho não deverá exceder 5 páginas.
- As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. As imagens deverão ser apresentadas em alta resolução (300 dpi) e de preferência coloridas.
- O(s) trabalho(s) deverão ser encaminhados para: rbpv-secretaria@rbpv.org.br.
- Os trabalhos podem ser redigidos nos idiomas português, espanhol ou inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente.
- Siglas e abreviações de nomes institucionais deverão aparecer entre parênteses e precedidas do nome por extenso.
- As citações no texto devem aparecer pelo sistema autor-data, conforme norma NBR 10520/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.
- Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: Título Original, Título Traduzido, Autor (es), Filiação, Referência (ABNT), Abstract, Keywords, Resumo, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (ou combinação destes três últimos), Agradecimentos (facultativo) e Referências Bibliográficas.
- As Notas de Pesquisa obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido.

Características dos Elementos de um Trabalho Científico

Título Original

“Deve designar o conteúdo ou assunto de uma publicação”. (ABNT 6022).

O título “cheio” e o subtítulo (se houver) deverão ser apresentados no idioma do artigo e não devem exceder 15 palavras.

No título, não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécie ou palavras em latim deverão vir em itálico.

Autor(es)/ Filiação:

“Pessoa(s) física(s) responsável(is) pela criação do conteúdo intelectual de um documento”. (ABNT 6022).

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso do primeiro autor (sem abreviação), seguido (na próxima linha) de um breve currículo que o qualifique na área de conhecimento do artigo e seu endereço completo. E assim sucessivamente para os demais autores.

A qualificação/afiliação na área deve conter: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, exatamente nessa ordem, e-mail atualizado (do autor), nessa ordem.

Referência

Após a filiação, deverá aparecer a referência do próprio artigo, seguindo as normas da ABNT (6023), para artigo completo de periódico e nota de pesquisa.

Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as citações de teses devem estar disponíveis para consulta.

Resumo

Deve conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento, redigido na língua de origem do trabalho. Não deve conter citações bibliográficas, siglas e abreviações. Deve ser informativo, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. Os trabalhos redigidos em língua inglesa deverão apresentar o resumo em língua portuguesa, seguido das palavras-chave.

Palavras-chave

Palavra(s) representativa(s) do conteúdo do documento, preferencialmente escolhida(s) de vocabulário controlado. Deve(m) aparecer logo abaixo do resumo na língua do texto, antecedida(s) da expressão que as designe.

Abstract

Deve ser sempre escrito em língua inglesa, em um único parágrafo sem deslocamento, inserido logo após as palavras-chave, constituindo-se em tradução fiel do resumo, seguido por keywords.

Keywords

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 5 (cinco).

Introdução

Explicação clara e objetiva do problema, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Trabalhos submetidos à avaliação em Comitê de Ética deverão incluir um parágrafo nesta seção para notificação.

Resultados

Sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações, autoexplicativas. O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente com os resultados e conclusão.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final. A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário, pois tabelas grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados. Todos os dados das tabelas devem ser digitados em minúsculo, exceto as siglas.

Figuras

As figuras são ilustrações, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema. Devem ser de boa qualidade (300 dpi), de preferência coloridas e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Neste caso, este item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, sem numeração, registrando-se o nome de todos os autores, usando as normas da ABNT (NBR 6023/2002), simplificada conforme exemplos:

1. Livro

LEVINE, J. D. **Veterinary Protozoology**. Ames: ISU Press, 1985. 414 p.

2. Artigo de Periódico Completo

BUGG, R. J.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; TOMPSON, R. C. A. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. **Veterinary Journal**, v. 157, n. 3, p. 295-301, 1999.

3. Tese, Dissertação

ARAUJO, M. M. **Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de Patos, Paraíba – Brasil**. 2002. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

4. Documento Eletrônico

CDC. Epi Info, 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/e2002.htm>>. Acesso em: 10 Jan. 2003.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Jaboticabal

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n - Zona Rural, CEP 14884-900 Jaboticabal - SP, Brasil




Profª. Dra. Rosângela Zacarias Machado (Editora-chefe)

Contato pelo e-mail: rbpv-secretaria@rbpv.org.br

Telefones: (16) 3209-2662; (16) 3209-2663; (16) 3209-2664

Anexo 4: Classificação dos periódicos na Qualis

16/2/2010 WebQualis - Consulta Periódicos

[CONSULTAR](#) | [DOCUMENTOS DE ÁREA](#) | [E-MAIL DOS COORDENADORES](#) | [LISTA COMPLETA](#)


LOGIN

Selecione o tipo de detalhamento da pesquisa:


[Por ISSN do Periódico](#) | [Por Título do Periódico](#) | [Por Classificação / Área de Avaliação](#)

* Ano-Base 2007

Título: veterinary parasitology



| ISSN | Título | Estrato | Área de Avaliação |
|-----------|------------------------------------|---------|---------------------------------|
| 0971-1031 | Journal of Veterinary Parasitology | B4 | MEDICINA VETERINÁRIA |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | A1 | CIÊNCIAS AGRÁRIAS I |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | A1 | INTERDISCIPLINAR |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | A1 | ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | A2 | ENGENHARIAS II |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | A2 | MEDICINA VETERINÁRIA |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | A2 | ODONTOLOGIA |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | A2 | SAÚDE COLETIVA |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | B1 | ENGENHARIAS IV |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | B1 | FARMÁCIA |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | B1 | MEDICINA II |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | B2 | BIOTECNOLOGIA |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | B2 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II |
| 0304-4017 | Veterinary Parasitology (Print) | B2 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III |



14/2/2010

WebQualis - Consulta Periódicos



WebQualis

Ajuda ?

CONSULTAR DOCUMENTOS DE ÁREA E-MAIL DOS COORDENADORES LISTA COMPLETA

LOGIN

Selecione o tipo de detalhamento da pesquisa:

[Por ISSN do Periódico](#)
[Por Título do Periódico](#)
[Por Classificação / Área de Avaliação](#)

* Ano-Base 2007

Título: REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA



| ISSN | Título | Estrato | Área de Avaliação |
|-----------|------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------|
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B3 | CIÊNCIAS AGRÁRIAS I |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B3 | INTERDISCIPLINAR |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B3 | MEDICINA I |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B3 | MEDICINA II |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B3 | MEDICINA VETERINÁRIA |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B3 | ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B4 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B4 | ENGENHARIAS II |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | B5 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | C | BIOTECNOLOGIA |
| 0103-846X | Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso) | C | QUÍMICA |



Anexo 5: Comprovação de submissão

19/2/2010

http://mail.uol.com.br/main/print_me...


● Submission Confirmation for Veterinary Parasitology

De: VETPAR

Para: silva.av@uol.com.br

Assunto: Submission Confirmation for Veterinary Parasitology

Data: 19/02/2010 10:43

Title: Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* of seronegative rodents from Brazil

Dear Dr da Silva,

Your submission has been received by the journal Veterinary Parasitology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/vetpar/>

Your username is: aristeu

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/VETPAR/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Veterinary Parasitology

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

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](#)