

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux (1908) de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) Lineaus (1758), na cidade de Uberlândia, MG

Carolina Salomão Lopes

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em ciências biológicas.

UBERLÂNDIA – MG
FEVEREIRO – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux (1908) de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) Lineaus (1758), da cidade de Uberlândia, MG

Carolina Salomão Lopes

José Roberto Mineo
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do curso de
Ciências Biológicas em ___/___/___

Vera Lúcia de Campos Brite
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

UBERLÂNDIA – MG
FEVEREIRO – 2007


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux (1908) de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) Lineaus (1758), na cidade de Uberlândia, MG


Carolina Salomão Lopes

Aprovada pela banca examinadora em: ____/____/____

Nota: _____



Prof. Dra. Eloisa Amalia Vieira Ferro



Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior



Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia, 8 de fevereiro de 2007

Dedicatória

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando a crescer, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e nos desafiam a construí-los. Quando nos damos conta, parece ser tarde para lhes agradecer todo o incentivo e dedicação. Então antes que realmente seja tarde demais dedico não apenas esse trabalho, mas todas as minhas conquistas profissionais à minha mãe (madrecita querida) Mariângela e ao meu irmãozinho amado Bruno, que em nenhum momento deixaram de me apoiar e me incentivar para seguir sempre em frente independente dos desafios e frustrações do cotidiano.

Dedico ainda este trabalho aos meus familiares (tios, primos e avô querido) e amigos que sempre acreditaram que poderia vencer e fazer a diferença, e a todos àqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

A todos os que buscam sentido para a vida, com uma perspectiva mais ampla do que os poucos anos que temos para nascer, crescer e trabalhar antes de deixar este mundo. A todos os que acreditam que o espírito é eterno, e que nossa vida neste mundo não se resume senão a um estágio de aprendizado rumo à perfeição.

A todos os que se esforçam para melhorar um pouco a cada dia, mesmo que muitas vezes falhando sob o peso das próprias imperfeições.

Àqueles que, mesmo sem conseguir fazer muita coisa, acenderam no seu íntimo a certeza de que a vida - como um todo - faz sentido, e que todos nós fazemos parte dela.

Carlos Ribeiro

Sumário

Resumo.....	01
Introdução.....	02
Material e métodos.....	03
Aves naturalmente infectadas e amostras de soro.....	03
Exames sorológicos.....	04
Teste de aglutinação modificado (MAT).....	04
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	05
Isolamento de <i>T. gondii</i> a partir de amostra de coração e cérebro de galinha caipira.....	05
Digestão péptica de tecidos para inoculação em camundongos.....	05
Bioensaio em camundongos.....	06
Isolamento e caracterização genotípica das novas cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	06
Detecção de camundongos soropositivos e manutenção das novas cepas.....	06
Extração de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i>	07
Genotipagem dos novos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i>	07
Caracterização biológica de <i>Toxoplasma gondii</i>	08
Análise estatística.....	08
Resultados.....	08
Detecção de galinhas soropositivas pelo teste MAT.....	08
Isolamento das cepas de <i>T. gondii</i> de galinhas caipiras a partir de inoculação de camundongos	09
Caracterização genética dos isolados de <i>T. gondii</i>	09
Comportamento biológico dos 2 isolados de <i>T. gondii</i>	10
Discussão.....	11
Conclusão.....	14
Agradecimentos.....	15
Referências Bibliográficas.....	15
Tabela 1.....	21
Tabela 2.....	23
Tabela 3.....	24
Tabela 4.....	25

Figura 1a.....	26
Figura 1b.....	27
Figura 2.....	28
Figura 3.....	29

1 **Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* de**
2 **galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) da cidade de Uberlândia, MG**

3
4 CAROLINA SALOMÃO LOPES^a, NEIDE MARIA DA SILVA^b, RODRIGO MARTINS
5 SOARES^c, HILDA FATIMA DE JESUS PENA^c, CHUNLEI SU^d, DEISE APARECIDA DE
6 OLIVEIRA SILVA^a, SOLANGE MARIA GENNARI^c, JOSÉ ROBERTO MINEO^a.

7 ^aLaboratório de Imunoparasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720,
8 Uberlândia, CEP 38400 902 – carol_salomao@yahoo.com.br

9 ^bLaboratório de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720,
10 Uberlândia, CEP 38400 902

11 ^cLaboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
12 Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, , USP, São Paulo, SP, Brasil

13 ^dDepartamento de Microbiologia, Universidade de Tennessee, Knoxville, TN 37996-0845, USA
14

15 **ABSTRACT**

16 The study of the prevalence of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens naturally infected is a
17 good indicator of prevalence of *T. gondii* oocysts in the environment because chickens feed from
18 the ground. Antibodies against *T. gondii* were evaluated in 108 serum samples of free-range
19 chickens from Uberlândia, MG, by using the modified agglutination test (MAT). A total of 77
20 (71%) out of 108 samples were positive (titer greater or equal 1:16) ranging from 1:16 to 1:4096,
21 but the title most frequently found was 1:32. *T. gondii* was isolated from heart samples from 2
22 (33%) of 6 free-range chickens seropositive in MAT. The isolates were genotyped using 12
23 *T.gondii* genetic markers including SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358,
24 PK1, a new SAG2 marker, Apico and CS3. The new *T. gondii* isolates from Uberlândia, MG,
25 showed alleles of type I, II and III genotypes. Thus, our results confirm previous studies that
26 found the high genetic variability in *T. gondii* isolated of Brazil.

27 Key-word: *Toxoplasma gondii*, free range chicken, *Gallus gallus domesticus*, genotyping

28

29 I – INTRODUÇÃO

30 *Toxoplasma gondii* é parasito intracelular obrigatório do filo Apicomplexa e apresenta
31 distribuição cosmopolita (Tenter *et al.*, 2000). É um parasito de grande importância veterinária e
32 médica, capaz de infectar a maioria dos vertebrados de sangue quente, bem como, a maioria das
33 espécies domésticas e silvestres (Tenter *et al.*, 2000). Apresenta ciclo de vida complexo com fase
34 assexuada em uma ampla variedade de hospedeiros intermediários e uma fase sexuada, não
35 obrigatória, que ocorre exclusivamente nas células epiteliais de hospedeiros felinos (Dubey;
36 Frenkel, 1972). A infecção por *T. gondii* é freqüente em humanos e sua prevalência varia de
37 acordo com a região e aumenta com a idade (Dubey; Beattie, 1987). No Brasil estima-se que
38 70% da população já entraram em contato com *T. gondii*, no entanto a infecção em indivíduos
39 imunocompetentes é assintomática em 90% dos casos. Nesse caso a infecção permanece latente
40 por tempo indeterminado, até que a imunidade do indivíduo diminua e ocorra a reativação da
41 infecção.

42 A toxoplasmose pode ser adquirida por ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida
43 de animais que atuam como hospedeiros intermediários (porcos, galinhas, carneiros, bovinos, e
44 outros), ou por oocistos presentes no ambiente (consumo de água e alimentos contaminados).
45 Outra forma de infecção é via congênita, através da transmissão transplacentária de taquizoítas
46 (Tenter *et al.*, 2000).

47 Os casos mais graves de infecção toxoplásmica são em indivíduos imunocomprometidos
48 (Belanger *et al.*, 1999) e em neonatos (contaminação por via congênita) (Jones *et al.*, 2001). Os
49 indivíduos sintomáticos podem apresentar gânglios linfáticos aumentados, febre, dores nos
50 músculos e articulações, cansaço, dores de cabeça, alterações visuais, dor de garganta,
51 surgimento de pontos avermelhados difusos por todo o corpo, aumento do fígado e do baço;
52 menos comumente ocorre inflamação do músculo do coração (Rey, 2001).

53 A patogenicidade da toxoplasmose é determinada por vários fatores, incluindo a susceptibilidade
54 da espécie hospedeira, virulência e estágio do parasito (Dubey, 2004). *T. gondii* é considerado
55 uma população clonal com baixa variabilidade genética (Dubey *et al.*, 2006). Isolados de *T.*
56 *gondii* são classificados em três tipos genéticos (I, II, III), com base na reação em cadeia da
57 polimerase (PCR) associada com a análise do polimorfismo fragmento de restrição (RFLP)
58 (Howe and Sibley, 1995). Apesar da diferença em nível de seqüência genômica entre os três
59 genótipos ser menor que 1%, a diferença fenotípica quanto a virulência em camundongos é
60 incrível, para cepas classificadas como Tipo I $LD_{100} = 1$, em contraste cepas classificadas como
61 Tipo II e III $LD_{100} \geq 10^3$ (Sibley and Boothroyd, 1992).

62 Vários estudos têm demonstrado que a maioria das linhagens de *T. gondii* é pouco virulenta para
63 camundongos (tipo III), produzindo infecções crônicas assintomáticas, enquanto outras linhagens
64 são bastante virulentas (tipo I) e promovem a morte dos camundongos (Dardé, 2004). A maioria
65 das informações sobre a genotipagem do parasito é derivada de isolados da Europa e América do
66 Norte. No entanto, a utilização de novos marcadores para caracterização gênica e a utilização de
67 cepas recentemente isoladas no Brasil e Guiana Francesa revelaram uma variabilidade genotípica
68 maior das que já haviam sido relatadas (Dubey *et al.*, 2006).

69 Pesquisas sobre a estrutura da população de *T. gondii* foram realizadas em diversas regiões do
70 mundo. Para esta finalidade, galinhas caipiras foram utilizadas como hospedeiros indicadores de
71 contaminação do solo por oocistos de *T. gondii*, devido a seus hábitos alimentares (Dubey *et al.*,
72 2006).

73 O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar através de genotipagem novas cepas
74 de *T. gondii* de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) da cidade de Uberlândia, Minas
75 Gerais.

76 **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

77 **2-1 - Amostras de soro de aves naturalmente infectadas**

78 Foram coletadas 108 amostras de sangue por meio de punção da veia braquial de galinhas
79 caipiras (*Gallus gallus domesticus*), na cidade de Uberlândia, localizada na porção sudoeste do
80 Estado de Minas Gerais, no Triângulo Mineiro, entre as coordenadas geográficas de 18°30' -
81 19°30' de latitude sul e 47°50' - 48°50' de longitude oeste de Greenwich.

82 O estudo envolveu dez locais diferentes da cidade (Campo Alegre, Capim Branco, Centro,
83 Lagoinha, Luizote, Martins, Morada Nova, Morumbi, Patrimônio, Val paraíso) (Figura 1a, 1b).
84 As aves utilizadas no presente estudo estavam naturalmente infectadas e não apresentavam
85 nenhum sintoma clínico de toxoplasmose. Após a seleção dos animais soropositivos para *T.*
86 *gondii*, as aves que apresentaram os maiores títulos de anticorpos anti-Toxoplasma (1:64, 1:128,
87 1:256 e 1:512) foram adquiridas. Seis aves naturalmente infectadas foram utilizadas para o
88 estudo de isolamento do parasito e caracterização genotípica dos novos isolados.

89 **2-2 - Exames sorológicos**

90 **2-2.1 - Teste de aglutinação modificado (MAT)**

91 Amostras de soros foram testadas para detecção de anticorpos contra *T. gondii* através de onze
92 diluições seriadas de 1:16 a 1:16384 pelo teste de aglutinação modificado (MAT), como descrito
93 por Dubey e Desmonts (1987).

94 Para a preparação da reação, taquizoítas foram coletados do exsudato peritoneal de camundongos
95 *Swiss* previamente infectados com a cepa RH de *T. gondii*. A suspensão parasitária foi lavada
96 quatro vezes (720 x g a 4°C por 10 minutos) com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M
97 (PBS, pH7, 2). Em seguida, os parasitos foram fixados com formalina 6% sob agitação por 12
98 horas a 4°C. Após nova lavagem com PBS, os parasitos foram quantificados e armazenados em
99 tampão alcalino (pH entre 8 e 9). Aos parasitos fixados (3×10^8 taquizoítas em 2500 µl de
100 solução alcalina) acrescentou-se 35 µl de Mercaptoetanol 0,2 M e 50 µl de Azul de Evans 0.2%.

101 Após a homogeneização, o antígeno foi adicionado (25 µl de reagente por poço) em uma
102 microplaca (96 poços) com fundo em U, seguindo pela adição (v/v) das amostras de soros
103 diluídos a 1:16 em PBS. A placa foi incubada à 37°C em câmara úmida por aproximadamente

104 doze horas. Como controles, amostras de soros (humano e de camundongos) positivos e
105 negativos, foram incluídas na reação. Os resultados foram analisados considerando a presença de
106 aglutinação dos parasitos para as amostras positivas e a formação de um botão com contorno
107 definido para as amostras negativas.

108 **2-2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

109 Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para avaliar a soroconversão dos
110 camundongos utilizados em experimentos de bioensaio. Placas de microtitulação de poliestireno
111 foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *T. gondii*, na concentração de 10 µg/ml em tampão
112 carbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS
113 adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As amostras de soros foram adicionadas, em
114 duplicata, na diluição de 1:16 em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé,
115 São Paulo, SP, Brasil) (PBS-TM). Após incubação por uma hora a 37°C, as placas foram lavadas
116 seis vezes com PBS-T. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo
117 conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Co., EUA) na diluição 1: 2000 em PBS-TM 5% e
118 incubado por uma hora a 37°C. Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, foi adicionado o
119 substrato enzimático consistindo de H₂O₂ a 0,03% em tampão cromógeno (orto-fenilenediamina
120 – OPD - a 1,0 mg/ml em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0). Após incubação por 10 minutos à
121 temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2 N. A densidade óptica
122 (DO) foi determinada em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Genebra,
123 Suíça) a 492 nm. Três soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O
124 *cut-off* (limite de positividade) foi determinado pela média dos valores de DO dos soros
125 controles negativos acrescido de cinco desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos
126 arbitrariamente em Índices ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: IE = DO amostra /
127 *cut-off* como previamente descrito (Silva et al., 2002). Valores de IE > 1,1 foram considerados
128 como positivos.

129 **2-3 – Isolamento de *T. gondii* a partir de amostras de coração e cérebro de galinha caipira**

156 genotípica. Após a lise total das células, taquizoítas foram coletados, lavados em PBS e
157 posteriormente filtrados em membrana de policarbonato de 3 µm (Millipore, Molsheim, France).
158 Os taquizoítas devidamente processados foram armazenados a -70°C para posterior
159 caracterização genotípica. Células HFF infectadas com os novos isolados de *T. gondii* foram
160 armazenadas no nitrogênio líquido em tubos de congelamento contendo dimetilsulfóxido
161 (DMSO) e 5% em soro fetal bovino.

162 **2-4.2 Extração de DNA de *Toxoplasma gondii***

163 A extração de DNA foi feita seguindo o protocolo de Ausubel *et al* (1999). Taquizoítas das
164 cepas isoladas em cultura de células e armazenadas a -70°C em PBS foram ressuspensas com
165 500 µl de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM; EDTA 25 mM; SDS 1%;
166 proteinase K 0,4mg/ml; água ultrapura autoclavada). Após a homogeneização, as amostras
167 foram incubadas durante a noite a 37°C, com agitação automática de quinze segundos a cada
168 quinze minutos.

169 Em seguida, foi adicionado fenol tamponado à amostra (v/v) e centrifugou-se a 12.000 x g por 5
170 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi recuperado, evitando a contaminação com fenol.

171 Para precipitar o DNA extraído, propanol (v/v) foi acrescentado, homogeneizado, e incubado a -
172 20°C durante uma noite. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 25 minutos a 4°C, o
173 sobrenadante foi desprezado e etanol a 70% foi adicionado, repetindo-se a centrifugação e
174 descartando-se novamente o sobrenadante. As amostras de DNA processadas foram permitidas a
175 secar completamente em temperatura ambiente e, em seguida, homogeneizadas com Tris-EDTA
176 (1/10 do volume final de DNA obtido), incubadas a 56°C por 10 minutos e, em seguida,
177 armazenadas a -20°C até a amplificação.

178 **2-4.3 Genotipagem dos novos isolados de *Toxoplasma gondii***

179 A caracterização genotípica dos isolados foi realizada no laboratório da Faculdade de Medicina
180 Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da
181 Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, com o auxílio do Dr. Rodrigo Martins Soares e na

182 Universidade de Tennessee, Departamento de Microbiologia, com o auxílio da Dra. Hilda Fátima
183 de Jesus Pena. A de terminação dos genótipos de *T. gondii* nas amostras analisadas foi feita
184 essencialmente como descrito por Howe *et al.* (1997), utilizando os primers para os seguintes
185 marcadores SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2, Apico e
186 CS3 (Tabela 1), na reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior análise do
187 polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP). Após a amplificação dos fragmentos, as
188 amostras foram submetidas à clivagem enzimática com endonucleases específicas para cada
189 fração (Tabela 1). O produto amplificado tratado com as endonucleases foi analisado em gel de
190 agarose a 2,5% e 3%.

191 **2-5 - Caracterização biológica de *Toxoplasma gondii***

192 Camundongos (*Swiss*, BALB/c e C57BL/6), gerbil (*Meriones unguiculatus*) e roedor do cerrado
193 (*Calomys callosus*) foram inoculados com 100 taquizoítas dos 2 isolados de *T. gondii* com o
194 intuito de observar a morbidade e a taxa de mortalidade nesses animais e estabelecer uma
195 comparação entre a virulência das cepas e a carga parasitária nestes animais.

196 **2-6 – Análise estatística**

197 A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste qui-quadrado para avaliar diferenças em
198 relação às curvas de mortalidade. Resultados foram considerados estatisticamente significativos
199 para $p < 0,05$. A análise estatística e os gráficos foram feitos utilizando GraphPad prism version
200 4.0 (GraphPad Software, v. 4.0, San Diego, USA).

201 **3 – RESULTADOS**

202 **3-1- Detecção de galinhas soropositivas pelo teste MAT**

203 Anticorpos contra *T. gondii*, foram encontrados em 77 (71%) das 108 amostras, com títulos
204 maiores ou iguais a 1:16 pelo MAT. Os títulos variaram entre 1:16 e 1:4096, sendo que o título
205 encontrado com maior frequência foi 1:32 (Tabela 2). As galinhas caipiras soropositivas para *T.*
206 *gondii* utilizadas no experimento de isolamento e caracterização genotípico de novas cepas de
207 *T.gondii*, apresentaram títulos sorológicos entre 1:64 e 1:512.

208 **3-2-Isolamento das cepas de *T. gondii* de galinhas caipiras a partir de inoculação de**
209 **camundongos**

210 Após a digestão péptica das amostras de coração e posterior inoculação subcutânea do cérebro e
211 dos corações das galinhas caipiras e dos camundongos *Swiss*, foi possível constatar a infecção
212 através de sinais clínicos e confirmar pelo ELISA a soroconversão dos animais inoculados com
213 duas amostras de coração das seis aves naturalmente infectadas com *T. gondii* utilizadas (Tabela
214 3). Aos 30 dias pós-inoculação, a análise sorológica indicou a soroconversão de quatro
215 camundongos, sendo que três animais foram inoculados com a mesma amostra de coração de
216 uma galinha caipira, e o outro camundongo foi inoculado com amostra de coração de outra ave.
217 Os dois novos isolados foram denominados de Udi1-CH05 e Udi2-CH05.
218 Os camundongos apresentaram fadiga respiratória, pelagem arrepiada, inapetência e apatia. No
219 cérebro desses animais soropositivos foi possível a detecção de cistos, no entanto, o exsudato
220 peritonal não demonstrou a presença de taquizoítas livres. Os cistos cerebrais foram contados e
221 camundongos *Swiss* foram utilizados para manutenção das duas novas cepas em vivo. Inoculou-
222 se 30 cistos em três animais e 50 cistos em outros três animais, por via intraperitoneal.
223 Observando a mortalidade e as causas da morbidade dos camundongos, notou-se a presença
224 constante de taquizoítas no exsudato peritonal desses animais.

225 As formas taquizoítas foram utilizadas para realizar passagens seriadas a cada dois ou três dias,
226 via intraperitoneal, para os dois isolados separadamente, com o intuito de manter as novas cepas
227 isoladas.

228 **3-3-Characterização genética dos isolados de *T. gondii***

229 Após 12 passagens, taquizoítas dos dois isolados foram cultivados in vitro com células HFF e
230 caracterizados genotipicamente utilizando doze diferentes primers. A análise da tipagem das
231 amostras pela clivagem enzimática com endonucleases foi avaliada através das bandas
232 encontradas no gel de agarose (Figura 2).

233 O resultado da genotipagem dos isolados nos indica que as cepas Udi1-CH05 e Udi2-CH05 são
234 resultantes de combinações de Tipo I, II e III, sendo que Udi-2CH-05 apresenta um alelo atípico
235 em c22-8, ou seja, apresenta um padrão diferente dos genótipos já identificados para *T. gondii*
236 (Tabela 4).

237 **3-4-Comportamento biológico dos 2 isolados de *T.gondii***

238 Em cultura foi possível observar diferenciação entre os isolados quanto ao tempo de rompimento
239 e infecção de novas células. O isolado Udi-1CH-05 apresentou multiplicação lenta em relação ao
240 Udi-2CH-05. Em média, 4 dias foram necessários para que o isolado Udi-1CH-05 rompesse a
241 maioria das células HFF, enquanto o isolado Udi-2CH-05 rompia todas as células em dois dias
242 de cultivo.

243 Diferentes comportamentos biológicos foram observados entre os dois isolados. O primeiro
244 isolado foi denominado de Udi-1CH-05 e caracterizou-se pela formação de cistos cerebrais após
245 o 20º dia de inoculação e presença de pequena quantidade de taquizoítas livres no exsudato
246 peritoneal na primeira passagem em camundongos *Swiss*. No entanto, na maioria dos animais
247 utilizados para o bioensaio de caracterização biológica das novas cepas, os animais inoculados
248 morreram no 6º e 7º dias pós-inoculação, e apresentaram taquizoítas livres no exsudato
249 peritoneal.

250 O segundo isolado foi denominado de Udi-2CH-05 e caracterizou-se pela presença de maior
251 quantidade de taquizoítas no exsudato peritoneal de camundongos *Swiss* no 3º, 4º e 5º dias pós-
252 inoculação, apresentando comportamento biológico semelhante com a cepa virulenta RH de *T.*
253 *gondii*.

254 Analisando-se as infecções experimentais em camundongos (*Swiss*, BALB/c e C57BL/6) e em
255 roedores gerbil (*Meriones unguiculatus*) e *Calomys callosus*, notou-se pequena taxa de
256 sobrevivência dos animais, independente dos isolados Udi-1CH-05 (Figura 3A) ou Udi-2CH-05
257 (Figura 3B), o que pode ser explicado pela classificação dos isolados como cepas virulentas
258 (Tipo I).

259 IV – DISCUSSÃO

260 A padronização do MAT exigiu sucessivas repetições do ensaio, e observou-se que para a
261 otimização do teste é necessário que a preparação do antígeno (taquizoítas fixados) seja feita
262 utilizando materiais esterilizados e os procedimentos devem ser realizados a 4°C, pois evita a
263 aglutinação dos parasitos. A aglutinação dos parasitos durante o processamento do antígeno pode
264 promover resultados falsos negativos, uma vez que os parasitos aglutinados tendem a se
265 acumular no fundo das cavidades das microplacas. A padronização da quantificação de
266 taquizoítas por poço é importante, pois o excesso de parasito pode promover resultados falsos
267 negativos, pois se acumulam no fundo da placa e a falta de parasitos juntamente com o excesso
268 de anticorpos promove o efeito prozona, que seria um falso negativo que ocorre devido ao
269 excesso de anticorpos no ensaio.

270 Para a detecção de anticorpos contra *T. gondii* em galinhas caipiras foi realizado exclusivamente
271 o teste sorológico MAT. Resultados obtidos em vários estudos anteriores utilizando galinha
272 caipira como modelo de infecção natural comprovaram a validade do teste MAT para este tipo
273 de estudo (Dubey *et al.*, 2006).

274 No presente estudo, isolou-se através de bioensaios em camundongos *Swiss*, duas cepas
275 procedentes de galinhas caipiras da cidade de Uberlândia, MG. O sucesso do isolamento de
276 novas cepas de *T. gondii* depende do número de camundongos inoculados, da quantidade de
277 tecido infectado utilizado no bioensaio, e da concentração de parasitos na amostra utilizada
278 (Dubey *et al.*, 2006).

279 O método sorológico utilizado para detectar a soroconversão dos camundongos foi o teste
280 imunoenzimático ELISA. As vantagens do ELISA sobre o MAT é que a leitura dos resultados é
281 objetiva, mais sensível e é capaz de distinguir anticorpos das classes IgG e IgM (Garcia *et al.*
282 2006).

283 Para a tipagem genética dos parasitos isolados utilizou-se o método RFLP (Sibley; Boothroyd,
284 1992), o qual permite a discriminação das cepas de *T. gondii* em três linhagens clonais

285 correlacionadas com o fenótipo de virulência em camundongos. Estudos de caracterização
286 genotípica intra-específica de *T. gondii* têm sido realizados em vários países, principalmente em
287 cepas de origem europeia e norte-americana. Até o momento pouco se conhece sobre as
288 características biológicas e moleculares das cepas isoladas no Brasil (Ferreira, 2004).

289 Durante a análise da caracterização genotípica é necessário ter cautela cautelosa na
290 interpretação dos dados, pois os marcadores utilizados estão restritos a identificar os parasitos já
291 isolados. Para os isolados de *T. gondii* que pertencem à mesma linhagem clonal, a informação
292 biológica (fenótipo) obtida de um representante pode prever a outra por causa de seu fundo
293 genético idêntico. O mesmo não pode ser verdadeiro para linhagens com diferente composição
294 gênica, principalmente quando o cruzamento genético entre diferentes linhagens acontece na
295 população. Estudos recentes de linhagens de *T. gondii* de pacientes humanos na Guiana francesa e
296 de galinhas caipiras no Brasil sugerem uma taxa elevada da transmissão e do cruzamento entre
297 diferentes linhagens do parasito (Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2004).

298 É importante analisar a diversidade gênica da população de *T. gondii*, pois segundo Dardé
299 (2004), a tipagem de multilocus é necessária para conhecer a real diversidade da população de *T.*
300 *gondii*, para encontrar fatores genéticos que podem influenciar a virulência do parasito e
301 entender o mecanismo de seleção genética de acordo com a espécie hospedeira.

302 No Brasil, observou-se uma variabilidade genotípica em isolados de *T. gondii*. Em estudos
303 genéticos recentes sobre o DNA de *T. gondii*, constatou-se novas combinações entre alelos nas
304 três linhagens conhecidas (Ferreira *et al.*, 2006), o que comprovou a diferenciação dos isolados
305 brasileiros quanto à diversidade e à variabilidade genotípica em relação aos isolados de locais
306 distintos como Estados Unidos e Europa.

307 Procedendo-se a uma comparação entre as duas cepas isoladas notou-se comportamentos
308 biológicos distintos, porém apresentaram similaridade gênica, sendo ambas tipificadas como
309 uma combinação do Tipo I, II e III. Segundo Dardé (2004) existe uma relação entre o genótipo e
310 as características biológicas das infecções por *Toxoplasma gondii*, mas não se pode desprezar a

311 interferência da resposta imune do hospedeiro no processo de infecção e determinação da
312 virulência.

313 No Brasil e Colômbia, as amostras de *T. gondii* isoladas de *Gallus domesticus* não apresentaram
314 cepas do Tipo II, analisando o *locus* SAG2 (Dubey *et al.*, 2006). As cepas isoladas foram
315 classificadas como Tipo I quando analisado apenas o *locus* SAG2 e como combinações dos
316 Tipos I, II e III quando analisados diversos *loci*. Nos vários trabalhos realizados no Brasil sobre
317 isolamento e caracterização genotípica de *T. gondii* em *Gallus domesticus* por SAG2, observou-
318 se uma prevalência de isolados do Tipo I em São Paulo (68%) (Dubey *et al.*, 2002), Rio de
319 Janeiro (70%) (Dubey *et al.*, 2003), Paraná (68%) (Dubey *et al.*, 2003) e Amazonas (54%)
320 (Dubey *et al.*, 2006).

321 A virulência de cepas de *T. gondii* para camundongos depende de vários fatores, incluindo o
322 estágio do parasito, se taquizoíta ou bradizoíta e a dose do inóculo, a via de inoculação, as
323 linhagens de camundongos utilizadas e a própria cepa do parasito (Dubey *et al.*, 2002).

324 A patogenicidade de *T. gondii* está estritamente relacionada à virulência da amostra e à espécie
325 hospedeira. As amostras de *T. gondii* variam em sua patogenicidade para os camundongos, sendo
326 altamente virulentas, ou não originando infecções crônicas. A virulência em camundongos é
327 normalmente determinada pela morbidade e mortalidade causadas pela amostra (Kaufman *et al.*,
328 1959).

329 Até o presente momento, todas as cepas isoladas de *Toxoplasma gondii* caracterizadas como
330 sendo Tipo I são virulentas para camundongos (Dubey *et al.*, 2003), o que pode explicar a alta
331 taxa de mortalidade dos camundongos inoculados com os isolados Udi-1CH-05 e Udi-2CH-05
332 em nossos estudos.

333 A taxa de mortalidade dos camundongos inoculados com 100 taquizoítas do isolado Udi-1CH-05
334 mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os camundongos mais susceptíveis
335 (BALB/c) e os camundongos mais resistentes (Swiss). Além disso, foi possível observar que os
336 camundongos isogênicos (BALB/c e C57BL/6) inoculados com 10^2 taquizoítas da cepa Udi-

337 1CH-05 apresentaram uma susceptibilidade maior quando comparado com os camundogos Swiss
338 e os roedores *Meriones unguiculatus* e *Calomys callosus*. No modelo murino de toxoplasmose,
339 C57BL/6 são considerados mais suscetíveis à infecção por *T. gondii* do que BALB/c quando
340 inoculados com cepas do tipo I (C56) ou tipo II (ME-49) (Suzuki, 1995 e 2000). Os
341 camundogos C57BL/6 (H-2^b) e de CBA (H-2^k) são geneticamente suscetíveis ao
342 desenvolvimento de encefalite toxoplásmica. Em contraste, linhagens geneticamente resistentes
343 (por exemplo, BALB/c [H-2^d]) podem controlar a infecção de *T. gondii*, desenvolvendo infecção
344 crônica latente, como os seres humanos imunocompetentes (Brown, 1995; Suzuki, 1991 e
345 Suzuki, 1994).

346 A taxa de mortalidade dos camundogos inoculados com 100 taquizoítas da cepa Udi-2CH-05
347 não mostrou diferenças significativas entre os grupos de animais, demonstrando que o isolado
348 Udi-2CH-05 é virulento e leva o animal a óbito independente da espécie.

349 As diferenças quanto ao fenótipo de virulência dos isolados de *T. gondii* em galinhas caipiras de
350 Uberlândia podem depender de combinações distintas de alelos em vários *loci*, embora as cepas
351 altamente virulentas pareçam compartilhar alguns *loci* que são únicos a essa linhagem (Ferreira,
352 2004).

353 Um melhor entendimento sobre a variabilidade genotípica e os traços biológicos dos isolados
354 Udi-1CH-05 e Udi-2CH-05 podem ser obtidos através do seqüenciamento genômica, que
355 fornece informações mais detalhadas sobre a evolução de genes, o nível de troca genética e a
356 estruturação populacional de *T. gondii*.

357

358 **V-CONCLUSÃO**

359 O estudo da infecção por *T. gondii* é importante uma vez que grande parte da população mundial
360 já entrou em contato com o parasito e pode manifestar a doença. A elevada ocorrência da
361 toxoplasmose em galinhas domésticas sugere a contaminação ambiental por oocistos de *T.*
362 *gondii*, uma vez que estes animais têm o hábito de ciscarem no solo e dessa forma servem de

363 sentinela ambiental auxiliando na adoção de medidas preventivas. As galinhas caipiras de
364 Uberlândia, MG, podem estar sendo uma importante fonte de contaminação e disseminação da
365 toxoplasmose. A utilização de marcadores diversos para genotipar novas cepas é necessária para
366 conhecer melhor a variabilidade gênica do parasito e poder correlacionar o genótipo e o fenótipo
367 dos novos isolados, tentando encontrar alguma relação entre a estrutura genética e virulência.

368

369 VI – AGRADECIMENTOS

370 A todos os colegas do Laboratório de Imunologia, em especial a Karine Rezende de Oliveira,
371 Leandro Hideki Ynoue, Belisa de Freitas Barbosa e Cristina Rostkowska pela ajuda e amizade,
372 ao técnico Antonio Tomáz Junior pelo auxílio na execução do projeto e ao CNPq pelo apoio
373 financeiro.

374

375 VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

376

377 Ajioka, J. W.; Fitzpatrick, J. M.; Reitter, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics, shedding light on
378 pathogenesis and chemotherapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2001

379

380 Ajzenberg, D.; Banuls, A.L.; SU, C.; Dumetre, A.; Demar, M.; Carne, B.; Darde', M.L.;
381 Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, n.34, p.
382 1185–1196. 2004.

383

384 Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K.
385 *Short protocols in molecular biology*. 4ª ed. New York: Wiley, 1999.p. 23-27.

386

387 Belanger, F.; Derouin, F.; Grangeot-keros, L.; Meyer, L. Incidence and risk factors of
388 toxoplasmosis in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients, 1988-1995. *Clinical*
389 *Infectious Diseases, Hemoco and Seroco study groups*, v. 25, p. 575-581, 1999.

390

391 Brown, C.R.; Hunter, C.A.; Estes, R.G.; Beckmann, E.; Forman, J.; David, C.; *et.al.* Definitive
392 identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis.
393 *Immunology*. v. 85, p. 419-428, 1995.

394

395 Dardé, M. L. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super Sanità*. v. 40, n.
396 1, p. 57-63, 2004.

397

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

400

401 Dubey, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. v.126, p. 57-72,
402 2004.

403

404 Dubey, J. P.; Desmonts, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts.
405 *Equine Veterinary Journal*, v.19, p. 377-339, 1987.

406

407 Dubey, J. P.; Frenkel, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *Journal of Parasitology*. v.19, p.
408 157-177, 1972

409

410 Dubey J. P; Gennari, S. M.; Labruna, M. B.; Camargo, L. M. A.; Vianna, M. C. B.; Marcet, P.
411 L.; Lehmann, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free range chickens from
412 Amazon, Brazil. *Journal of Parasitology*. v.92, n. 1, p. 36-40, 2006a.

413

414 Dubey, J. P.; Graham, D. H.; da Silva, D. S.; Lehmann, T.; Bahia-Oliveira, L. M. *Toxoplasma*
415 *gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype,
416 and oocyst shedding by cats. *Journal of Parasitology*. v. 89, n.4, p. 851-853, 2003a.

417

418 Dubey, J. P.; Su, C.; Oliveira, J.; Morales, J. A.; Bolaños; Sundar, N.; Kwok, O. C. H.; Shen,
419 S.K. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free range chickens
420 from Costa Rica, Central America. ***Veterinary Parasitology***. v.139, p. 29-36, 2006b.

421

422 Dubey, J. P.; Navarro, I. T.; Graham, D. H.; Dahl, E.; Freire, R. L.; Prudêncio, L. B.; Sreekumar,
423 C.; Viana, M. C.; Lehmann, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range
424 chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 177: p. 229-234, 2003b.

425

426 Dubey, J. P.; Graham, D. H.; Blackston, C. R.; Lehmann, T.; Gennari, S. M.; Ragozo A. M. A.;
427 Nishi, S. M.; Shen, S.K.; Kwok, O. C. H.; Hill, D. E.; Thulliez, P. Biological and genetic
428 characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São
429 Paulo, Brazil: unexpected findings. *International Journal for Parasitology*. v. 32, p. 99-105, 2002.

430

431 Fazaeli, A.; Carter, P.E.; Darde', M.L.; Pennington, T.H. Molecular typing of *Toxoplasma gondii*
432 strains by GRA6 gene sequence analysis. ***International Journal for Parasitology***. v.30, p.637-
433 642. 2000.

434

435 Ferreira, a. M. Caracterização molecular de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas no Brasil. Belo
436 Horizonte. Dissertação (Doutorado em ciências). Universidade Federal de São Paulo, 2004.
437 188p.

438

439 Ferreira, A. M.; Vitor, R. W. A; Gazzinelli, R. T.; Melo, M. N. Genetic analysis of natural
440 recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics*
441 *and Evolution*. v.6, p. 22-31, 2006.

442

443 Garcia J. L.; Navarro, I. T.; Vidotto, O.; Gennari, S. M.; Machado, R. Z.; Pereira, A. B. L.;
444 Sinhorini, I. L. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for
445 antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*. v. 113, p.
446 100-105,2006.

447

448 Grigg, M.E.; Ganatra, J.; Boothroyd, J.C.; Margolis, T.P. Unusual abundance of atypical strains
449 associated with human ocular toxoplasmosis. *Journal of Infectious Diseases*. v. 184, p. 633–639.
450 2001.

451

452 Howe, D. K.; Honoré, S.; Derouin, F.; Sibley, L. D. determination of genotypes of *Toxoplasma*
453 *gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 35,
454 n. 6, p. 1411-1414, 1997.

455

456 Howe, D. K.; Sbley, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages, correlacion of
457 parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, v.172, p. 1561-1566,
458 1995.

459

460 Jones, J. L.; Kruszon-moran, D.; Wilson, M.; Mcquilan, G.; Navim, T.; Mcauley, J. B.
461 *Toxoplasma gondii* infection in the United States, seroprevalence and risk factors. *American*
462 *Journal of Epidemiology*. v. 154, p. 357-365, 2001.

463

464 Kaufman, H. E. ; Melton, M. L.; Remington, J. S. ; Jacobs, L. Strains differences in *Toxoplasma*
465 *gondii*. Journal of Parasitology, v. 45, n. 2, p. 189-190, 1959.

466

467 Khan, A.; Taylor, S.; Su, C.; Mackey, A.J.; Boyle, J. ; Cole, R.; Glover, D.; Tang, K.; Paulsen,
468 I.T.; Berriman, M.; Boothroyd, J.C. ; Pfefferkorn, E.R.; Dubey, J.P., Ajioka, J.W., Roos, D.S.,
469 Wootton, J.C., Sibley, L.D. Composite genome map and recombination parameters derived from
470 three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucl. Acids Res. N. 33, P. 2980–2992, 2005.

471

472 Lehmann, T.; Blackstone, C.R.; Parmley, S.F.; Remington, J.S.; Dubey, J.P. Strain typing of
473 *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. Journal of
474 Parasitology. v. 86, p. 960–971, 2000.

475

476 Lehmann, T.; Graham, D.H.; Dahl, E.R.; Bahia-Oliveira, L.M.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.
477 Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic
478 selection in maintaining linkage disequilibria. Infection, Genetics and Evolution. v. 4, p. 107–
479 114, 2004.

480

481 Lemos JC, Lima SC, Pajuaba Neto AA, Casagrande B, Vieira GSS, Ferrete JÁ, Magalhães MJO.
482 Encontro de *Lutzomyia longipalpis* na área de implantação da Usina Hidrelétrica Capim Branco
483 I, na bacia do rio Araguari, no município de Uberlândia, Minas Gerais — Brasil. Disponível em:
484 <www.ig.ufu.br/revista/volume11/artigo12_vol11.pdf>. Caminhos de Geografia 11:186-198,
485 2004.

486

487 Rey, L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: Rey, L. *Parasitologia*. 3^a ed. Rio de Janeiro:
488 Editora Guanabara Koogan, 2001, p.321-344.

489

490 Sibley, L. D.; Boothroyd, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal
491 lineage. *Nature*, v.359, p. 82-85, 1992.

492

493 Silva, D.A.O; Silva, N.M.; Mineo, T.W.P.; Pajuaba Neto A.A.; Ferro, A.V.; Mineo, J.R.
494 Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs
495 experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. *Veterinary Parasitology*, v. 107,
496 p.181-195, 2002.

497

498 Su, C.; Zhang, X.; Dubey, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP
499 markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International*
500 *Journal for Parasitology*. v 36, p. 841–848, 2006.

501

502 Suzuki, Y.; Joh, K.; Kwon, O.C.; Yang, Q.; Conley, F.K.; Remington, J.S. MHC class I gene (s)
503 in the D/L region but not the TNF- α gene determines development of toxoplasmic encephalitis in
504 mice. *Journal of Immunology*. v. 153, p. 4649-4654, 1994.

505

506 Suzuki, Y.; Joh, K.; Orellana, M.A.; Conley, F.K.; Remington, J.S. A gene (s) within H-2D
507 region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. ***Immunology***. v. 74, p.
508 732-739, 1991.

509

510 Suzuki, Y.; Kang, H.; Parmley, S.; Lin, S.; Park, D. Induction of tumor necrosis factor- α and
511 inducible nitric oxide synthase fails to prevent toxoplasmic encephalitis in the absence of

512 interferon- γ in genetically resistant BALB/c mice. *Microbes and Infection*. v. 5, p. 455-462.
513 2000.
514
515 Suzuki, Y.; Yang, Q.; Remington, J.S. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends
516 on the strain of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*. v. 81, p. 1032-1034, 1995.

Tabela 1: Marcadores utilizados para a determinação do genótipo dos isolados.

Marcador	Cromossomo	PCR primer	Tamanho (pb)	Enzima de restrição	Digestão enzimática e eletforese	Referências
c22-8	Ib	c22-8F: TCTCTCTACGTGGACGCC c22-8R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	BsmA I, Mbo II	NEB2, BSA, 37 °C 30 min 55 8C 30 min 2.5% gel	Khan <i>et al.</i> (2005).
c29-2	III	c29-2F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC c29-2R: TGTCTAGGAAAGAGGCCG	446	HpyCH4IV, Rsa I	NEB1, BSA, 37 °C 60 min 2.5% gel	Khan <i>et al.</i> (2005).
L358	V	L358-F2: AGGAGCGGTAGCCCAAGT L358-R2: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	Hae III, Nla III	NEB4, BSA, 37 °C 60 min 2.5% gel	Khan <i>et al.</i> (2005).
PK1	VI	PK1-F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT PK1-R: TCATCGCTGAATCTCATTTGC	903	Ava I, Rsa I	NEB4, BSA, 37 °C 60 min 2.5% gel	Khan <i>et al.</i> (2005).
Novo SAG2	VIII	SAG2-Fa: ACCCATCTCGGAAGAAACG SAG2-Ra: ATTTCCGACCAGCGGGAGCAC	546	Hinf I, Taq I	NEB3, BSA, 37 °C 30 min, 65 8C 30 min 2.5% gel	Lehmann <i>et al.</i> (2000).
BTUB	IX	Btb-F: GAGGTCATCTCGGACGAACA Btb-R: TTGTAGGAACACCCCGACGC	411	BsiE I, Taq I	NEB4, BSA, 60 °C 60 min 2.5% gel	Khan <i>et al.</i> (2005).
GRA6	X	GRA6-F1: TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6-R1x: TCGCCCCAAGAGTTGACATAG	344	Mse I	NEB2, BSA, 37 °C 60 min 2.5% gel	Fazaeli <i>et al.</i> (2000).
SAG3	XII	P43SI: CAACTCTCACCAATCCACCC-3 P43ASI:	311	Nci I	NEB4, BSA, 37 °C 60 min 2.5% gel	Grigg <i>et al.</i> (2001).

Apico	Plasmideo	GGCGGTTGTTAGACAAGACA Apico-F: TGCAAATTCCTTGAAATTCAGTT Apico-R: GGGATTCCGAACCCCTTGATA	640	Afl II, Dde I	NEB2, BSA, 37 °C 60 min 3% gel	Su <i>et al.</i> (2006)
CS3	VII	AGCGGATTTCCAAACACTGTC and CS3-R: CTGCTGCATTCACAAACTCC SAG1-F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC SAG1-R: CAACGGTAATCACCTCACGCGG SAG2-F: GGAACGGCAACAATGAGTTT; SAG2-R: GCACTGTTGTCAGGGTTT;	794	NlaIII MboI	NEB4, BSA, 37 °C 60 min 2.5% gel	Su <i>et al.</i> (<i>in press</i>)
SAG1	VIII		1183	DdeI, Sau96I	NEB3, BSA, 37 °C 30 min 2.5% gel	Howe and Sibley (1995)
SAG2	VIII		-	Him6I, Mbo	BSA, 37 °C 120 min 2.5% gel	Dubey, <i>et al.</i> (2003a)

Tabela 2: Títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* determinados pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em amostras de soros de galinhas caipiras de diferentes bairros de Uberlândia, MG.

Bairro	Nº de amostras testadas	Amostras reativas	Título de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>								
			1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Martins	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Campo Alegre	10	8	7	1	0	0	0	0	0	0	0
Capim Branco	6	5	3	1	0	0	0	0	1	0	0
Centro	9	7	2	2	2	0	1	0	0	0	0
Lagoinha	11	11	1	5	2	0	2	1	0	0	0
Luizote	7	5	1	0	1	2	1	0	0	0	0
Morada Nova	31	24	3	7	5	2	6	1	0	0	0
Morumbi	10	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Patrimônio	10	4	2	1	0	1	0	0	0	0	0
Val Paraíso	10	10	0	2	1	0	3	1	2	0	1
Total	108	77	19	21	12	5	13	3	3	0	1
Porcentagem (%)	100	71	18	19	11	5	12	3	3	0	0

Tabela 3: Isolamento de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) de Uberlândia, MG

Numeração da ave	Bairro de procedência	Títulos de anticorpos pelo MAT	Camundongos inoculados com cérebro de galinha caipira		Camundongos inoculados com coração de galinha caipira		Designação do isolado
			Nº de inoculados	Mortalidade	Nº de inoculados	Mortalidade	
853	Morumbi	1:64	3	N	3	N	-
808	Patrimônio	1:128	3	3	3	1	Udi-2CH-05
833	Luizote	1:128	3	N	3	N	-
883	Luizote	1:256	3	N	3	N	-
880	Morada Nova	1:512	3	N	3	3	Udi-1CH-05
836	Morada Nova	1:64	3	N	3	N	-

N: camundongos soronegativos em todas as análises.

Tabela 4: Genotipagem dos isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) de Uberlândia, MG

Isolado	Marcadores utilizados											
	SAG2	GRA6	Novo SAG2	SAG3	Apico	c22-8	L358	BTUB	CS3	SAG1	c29-2	PK1
Udi-1CH-05	I	III	II	III	III	I	I	III	I	I	III	II
Udi-2CH-05	I	II	I	III	I	u-1	I	I	I	I	I	I

u-1 Padrão de marcador diferente de I, II e III



Lemos et al.: 2004

Figura 1a: Localização da cidade de Uberlândia no mapa do Brasil

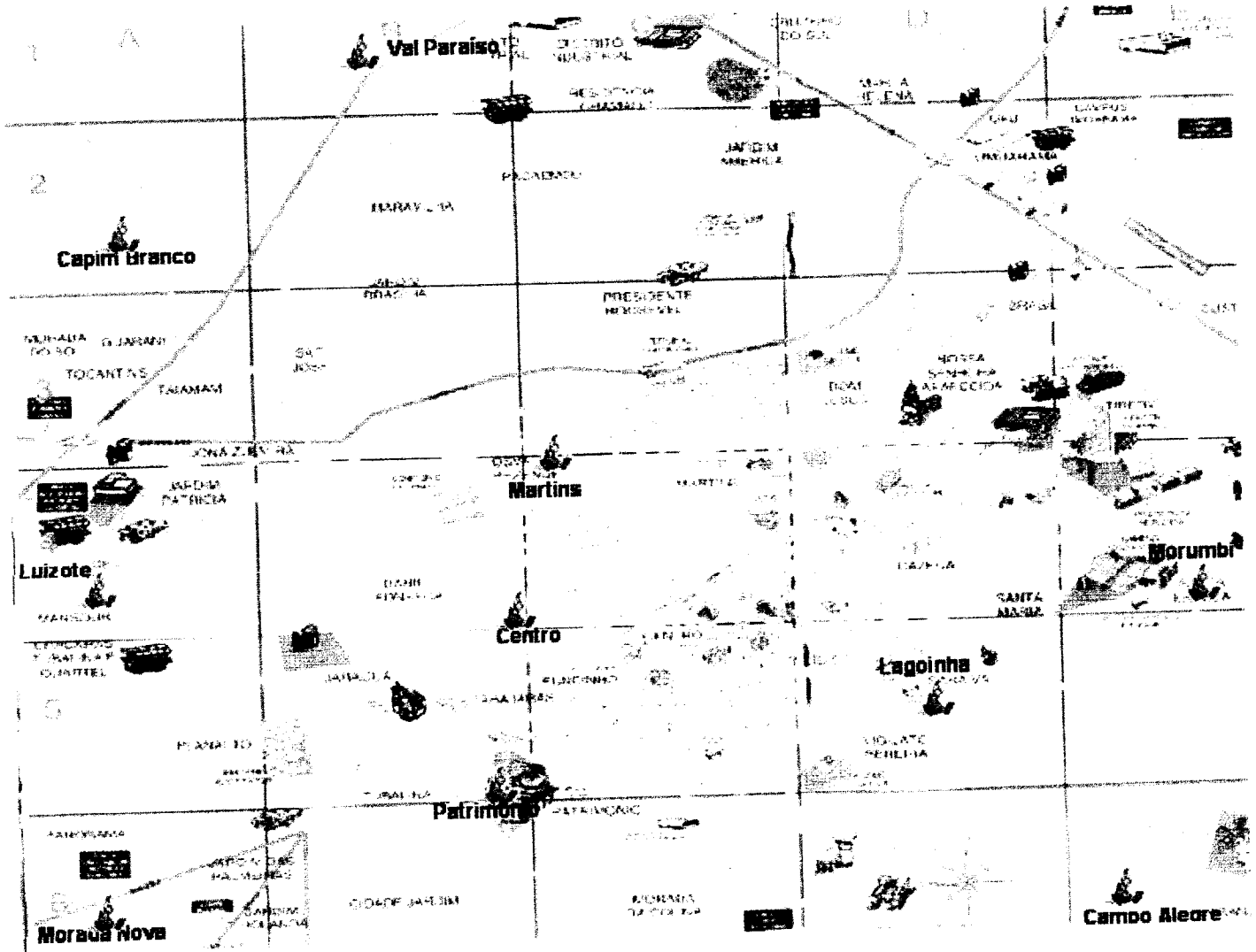



Figura 1b: Mapa da cidade de Uberlândia com os pontos de coleta ()

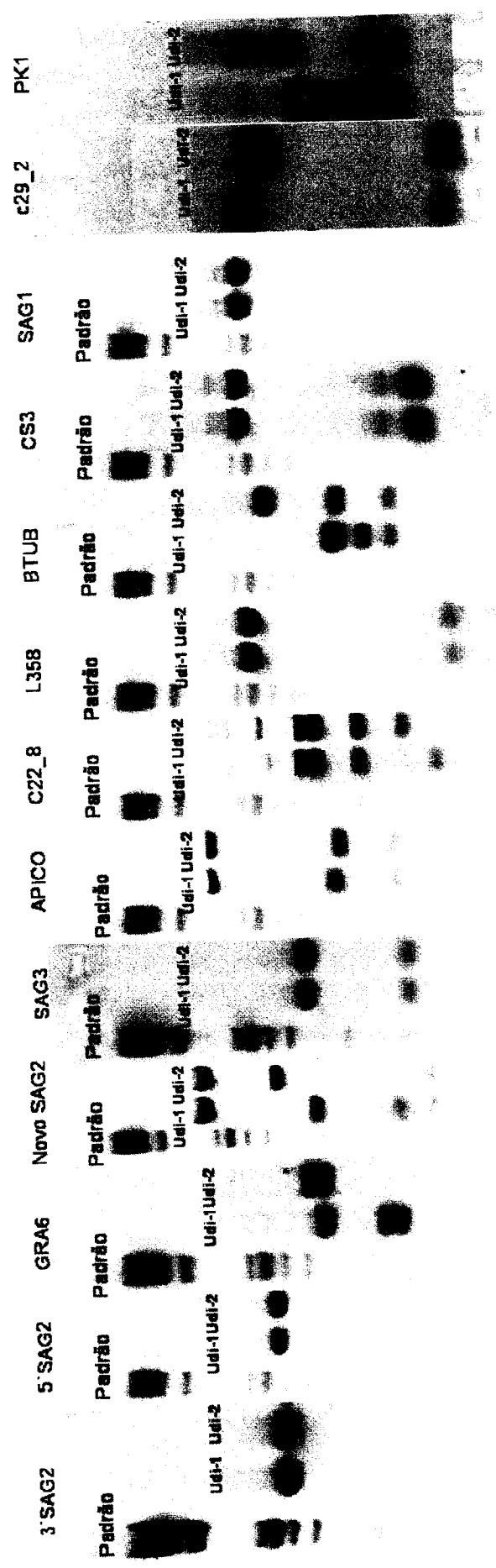


Figura 2: Imagem de geis de agarose para os marcadores utilizados na caracterização genotípica das cepas isoladas.

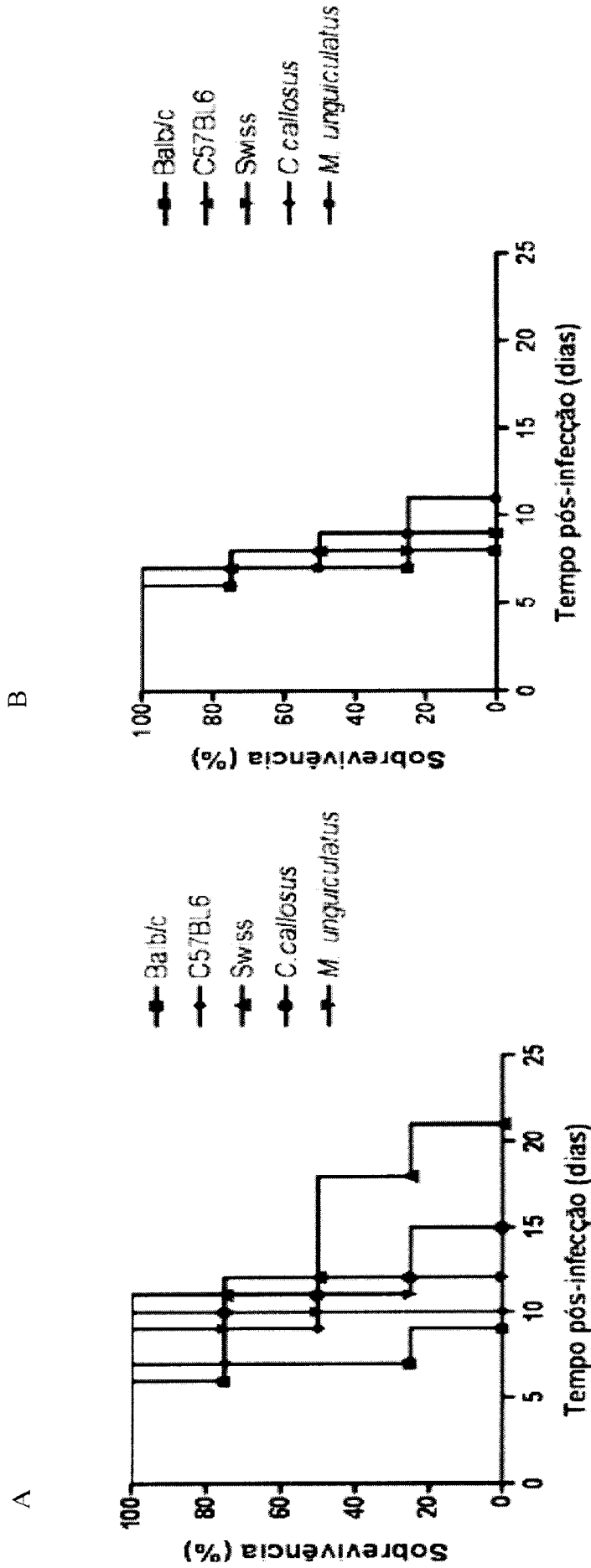


Figura 3: Taxa de mortalidade de camundongos (BALB/c, C57BL6 e Swiss) e roedores (*Meriones unguiculatus* e *Calomys callosus*), inoculados com 10^2 taquizoítas do isolado Udi-1CH-05 (A) e Udi-2CH-05 (B)

International Journal for Parasitology

INSTRUCTIONS TO AUTHORS (see also <http://www.elsevier.com/locate/ijpara>)

Submission: All papers should be submitted on-line via: <http://ees.elsevier.com/ijpara>

General enquiries prior to submission should be directed to the Editorial Office: editor@IJP.org.au

Prior to submitting a paper it is best to prepare information and a set of files for submission. These files together with preferred file types are listed below. Formatting and style issues are listed further below:

Required Information:

- Name, affiliation, email and mail address information for one corresponding author. This must be the same person nominated as corresponding author on the manuscript title page and this person must submit the manuscript on-line.
- Name and affiliations of all other authors.
- The type of paper you are submitting (Research paper or Rapid Communication).
- **(Note: Current Opinions and Invited Reviews are by invitation only)**

Files: Submission files should be arranged in the following order prior to pdf conversion by the system.

Author agreement (optional at submission, mandatory with or before revision).

Cover letter is mandatory for all submissions and should address the novelty, significance and implications of the work, together with four suggested referees.

Manuscript containing (in order) Title, Authors and addresses, Corresponding Author and address, Abstract, Keywords. In numbered sections: 1. Introduction; 2. Materials and methods; 3. Results;

4. Discussion; then Acknowledgements; References; Legends to Figures.

Tables with their legends (in separate or combined files, numbered, in order).

Figures (in separate files); preferred formats: jpg, tif or gif.

Supplementary and multimedia files.

For the text: The preferred text format is Microsoft Word. The title page, abstract and text should be formatted with line numbers. In Word, go to file/page setup/layout/line numbers. Click on 'add line numbering', then click on 'continuous' then 'OK' and 'OK' again. The manuscript should be formatted to A4 size paper, in English, double spaced and with 2 cm margins.

Author agreements: The electronic submission should be followed by a letter including the manuscript title, author names, a statement confirming that each author has read the manuscript and accepts responsibility for its contents, a statement of financial or other relationship that might lead to a conflict of interests, together with the signatures of all authors. This letter should be faxed or e-mailed to:

Editor-in-Chief, International Journal for Parasitology

Fax: +61 (0) 3 9345 2130; E-mail: editor@IJP.org.au

During submission you will also have to agree to an "Ethics in Publishing" document.

General. The journal publishes the results of high quality original research in all aspects of basic and applied parasitology, including all the fields covered by its Specialist Editors, and ranging from parasites and host-parasite relationships of intrinsic biological interest to those of social and economic importance in human and veterinary medicine and agriculture. Original research includes the development of new concepts and techniques, as well as experimental and observational science. Because of its breadth of discipline coverage, the aims and significance of all contributions should be made clear to readers who are not expert in the particular subject of papers. In applied parasitology, it will tend to favour contributions of broader significance to the subject rather than narrow, highly specialised applications. All papers are peer reviewed.

There are no page or submission charges. Twenty-five free reprints will be provided.

There are two types of papers, structured as follows:

Original Research Papers

Title page. Contains the title, authors' names, addresses, name and contact details of the corresponding author.

Abstract. The second page contains an Abstract of not more than 300 words in a single paragraph. At the foot of this page a list of up to 8 Index Keywords should be provided.

Text. (see sections above) In addition to major headings two forms of subheadings are used: (a) the numbered italicised side subheading referring to several paragraphs; (b) the italicised paragraph subheading at the beginning of a single paragraph used only in Materials and methods.

Rapid Communications

The journal offers particularly rapid publication of highly significant findings. The covering letter must contain an explanation as to why the work is of such significance to justify publication as a Rapid Communication. Authors are

and the
final
prior

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

ns of
in four

display items (figures or tables). The article must not be preliminary but will describe significant and substantial new findings, be complete in itself and not be published at a later date in greater detail. The typescript should be marked "RAPID COMMUNICATION" on the top left-hand corner of the title page. The first page should show title, author and address details. A short Abstract of not more than 100 words in the same style as for full papers plus up to six Keywords should follow. The text of the paper is next, written with a minimum number of paragraphs and no headings. Not more than 20 essential references should be given. Other instructions are the same as those for full papers.

Acknowledgements. Authors should provide confirmation of consent from persons acknowledged in manuscripts eg. personal communications. This can be provided in a covering letter or by e-mail to the editorial office.

References. Correct references are the responsibility of the author. Please ensure that all references cited in the text are included in the reference list. References in the text start with the name of the author(s), followed by the publication date in brackets, e.g. 'Combes (2001) has shown the importance of ...', or '... has been described (Combes, 2001; Kumar et al., 2004) ...', using date order. More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by two authors, use (Sangster and Dobson, 2002) or for more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. There is an output style available for EndNote. Please refer to the EndNote website or contact the Editorial Office for a copy of this style file.

The references in the reference list should be in alphabetical order. References to journal articles should contain names and initials of all author(s), year of publication, article title, abbreviation of the name of the journal according to the *List of Serial Title Word Abbreviations* (International Serials Data System, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8), volume number and page numbers.

Unpublished data, personal communications and papers "in preparation" or "submitted", abstracts (whether published or not) and theses should not be listed in the references (but may be incorporated at the appropriate place in the text); work "in press" may be listed only if it has been accepted for publication. Personal communications must be accompanied by a letter or e-mail from the named person(s) giving permission to quote such information. References to books should also include the title (of series and volume), initials and names of the editor(s) and publisher and place of publication.

Examples:

Combes, C., 2001. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. University of Chicago Press, Chicago and London.

Kumar, N., Cha, G., Pineda, F., Maciel, J., Haddad, D., Bhattacharyya, M.K., Nagayasu, E., 2004. Molecular complexity of sexual development and gene regulation in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 1451-1458.

Pettersson, E.U., Ljunggren, E.L., Morrison, D.A., Mattsson, J.G., in press. Functional analysis and localisation of a delta-class glutathione S-transferase from *Sarcoptes scabiei*. *Int. J. Parasitol.*

Sangster, N.C., Dobson, R.J., 2002. Anthelmintic resistance. In: Lee, D.L. (Ed.), *The biology of nematodes*. Taylor and Francis, London and New York, pp. 531-567.

Tables. These should be self-explanatory, each on a separate page with its title at the top, numbered consecutively. There should be no vertical lines in tables. Abbreviations if used at all, should be explained as footnotes identified by small superscript alphabetical characters.

Abbreviations. Avoid the use of abbreviations, but if necessary, authors should use the list printed at the end of these Instructions as a guide to those terms that need not be given in full, or define each abbreviation on first use.

Figures. Illustrations of all kinds should be listed together under "Legend to Figures" numbered consecutively and their positions indicated in the text. Figures should be high quality, of an adequate size to ensure clarity, and letters and numbers should be at least 4 mm in height. Magnification should be indicated by inclusion of a scale bar in the figure and its value should be indicated on the figure or in the legend. Each figure should be obvious from its file name. If images have been altered, describe the nature of changes made and software used. This information should be included in the 'Materials and methods' section of the manuscript.

In general, figures will be printed and appear on electronic versions of papers in black and white. Where appropriate, colour figures can be provided on the electronic version, but black and white in the printed version. Authors should note that the figure legend will be the same in both versions. While there is no charge for colour in electronic versions, there generally is a fee for printed colour figures. Please contact the Editorial Office for the current policy.

Supplementary files. For non-integrated supplementary files, a footnote should be typed on the title page of the manuscript: "Note: Supplementary data associated with this article". A copy of supplementary material should be submitted at the same time as the manuscript. Preferred formats are Microsoft Office for text or graphics and avi for movie files. Maximum size of files is 10 MB. Files too large to submit online should be sent to the journal office on CD.

Submission of sequence data to databases. Novel nucleotide or protein sequence data must be deposited in the GenBank™, EMBL or DDBJ databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the collaborating databanks is sufficient to ensure entry in all. The accession number should be included as a footnote on the title page of the manuscript: 'Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession number(s)'. If requested the database will withhold release of data until publication. The usual method for submitting sequence data is by th

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

http://w

submis

s, can

be more easily prepared with the Sequin programme (available from the above Web sites). Authors are encouraged by the databases to update their entries as the need arises.

GenBank/DNA sequence linking. In order for automatic links to be made between papers and GenBank, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See the example). When published they will appear in normal type.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**").

Additionally, any multiple alignments of nucleotide or protein data must be submitted to a recognised database and must also receive a unique accession number. The accession number can appear in the text in the relevant section of the Results, as: 'Alignment files are available by anonymous FTP from FTP.EBI.AC.UK in directory/pub/databases/embl/align or via the EMBLALIGN database via SRS at <http://srs.ebi.ac.uk>; under accession(s)'. The usual method for submitting alignments is by the World Wide Web to the European Bioinformatics Institute (via Webin-Align: <http://www.ebi.ac.uk>). Microarray data, in MIAME-compliant format, should be submitted to ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Accession identifiers relating to the data should be provided in the manuscript text.

Policy on bioinformatics papers. In silico analysis: The following guidelines apply to papers that exclusively use in silico analysis or rely heavily on this approach for analysis and conclusions. Such papers should address a significant biological issue or issues. Bioinformatic data should be supported by novel or published biological data. Work would typically use information from a number of databases and even from a number of parasite or host species and use a number of analytical methods. Types of "metaanalysis" are encouraged either across a wide range of parasites or, say, at a number of points in a metabolic or signalling pathway or an immune cascade. In silico analysis may be especially suitable for review articles.

Taxonomic publications. Taxonomic papers should be of broad interest, going beyond purely morphological descriptions which are best suited to specialist journals. Examples of contributions of broader interest include description of new taxa which do not fit within accepted classifications, analyses which are of phylogenetic or biogeographic significance employing a range of analysis techniques or which include information on host-parasite relationships or deleterious effects on the host. Presentations which include description of new species should conform to a prescribed pattern as follows: where the new species name is written for the first time, "n.sp." should succeed it. The name should be followed by: (1) a description, in telegraphic style, i.e. without articles and verbs, of the specific characters; accompanied by illustrations depicting the main differentiating characters; (2) a diagnosis, emphasising the characters of the new species or genus; (3) the details of type material, (host, location in host, geographic locality, collector, place of deposition and registration). Synopses (a brief summary of a small taxonomic group of parasites) and checklists (a list of parasites from particular hosts in particular localities) are acceptable, provided species named are critically evaluated and identifications are sound. Specimens upon which new host or locality records are based must be deposited in a museum or recognised collection to be available for further study and registration numbers must be cited. Names, authors and years of publication of original descriptions of named species should be cited in the text in the manner recommended by the International Code of Zoological Nomenclature.

Care of experimental animals. It is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with their national animal ethics guidelines. Submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially interventions such as surgery and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

Statistical analysis. Authors should seek advice on data analysis prior to submission. A commentary (Morrison, D.A., 2002. How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *Int. J. Parasitol.* 32, 1065-1070) may also be consulted. Papers may be sent to referees with particular expertise in statistics and modelling.

The review process. The corresponding author, through the web access, is responsible for actions with respect to each paper. E-mail prompts will be delivered only to the corresponding author. Articles can also be tracked by the corresponding author via the online system.

Proofs. Page proofs for correction will be e-mailed to the corresponding author in pdf format by the Publisher. **It is the responsibility of the author to ensure that the proof contains no errors and any corrections are returned to the Publisher within 48 hours of receipt. Only one set of changes will be made to a proof.** Authors should not correct changes that may have been made by the Editor-in-Chief or the Publisher to conform with required presentation, but may refer to them in an accompanying letter to the Production Editor. Proofs, copyright transfers and order for reprints should be returned to:

Elsevier Ireland Ltd, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland
Tel.: +353-61-709600; fax: +353-61-709100

Author Enquiries. For enquiries relating to the submission of articles please visit the Author Gateway from Elsevier at <http://authors.elsevier.com>.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

STANDARD ABBREVIATIONS (These terms need not be given in full)

absorbance <i>A</i>	molar (concentration) <i>M</i> or mol L ⁻¹
ampere <i>A</i>	mole <i>mol</i>
aqueous <i>aq</i>	molecular mass (relative) <i>M_r</i>
	molecular weight <i>mol. wt</i>
base pair <i>bp</i>	monoclonal antibody <i>mAb</i>
becquerel <i>Bq</i>	million years <i>Myr</i>
bovine serum albumin <i>BSA</i>	
	normal (concentration) <i>N</i>
central nervous system <i>CNS</i>	(with chemical formula) <i>N-</i>
cerebrospinal fluid <i>CSF</i>	not significant <i>NS</i>
chi-squared (statistics) χ^2	number of observations (statistics) <i>n</i>
concanavalin agglutinin <i>Con A</i>	
coulomb <i>C</i>	optical density <i>O.D.</i>
counts min ⁻¹ , counts s ⁻¹ <i>c.p.m.</i> , <i>c.p.s.</i>	osmolar <i>OSM</i> or <i>osmol L⁻¹</i>
dalton (use for molecular mass) <i>Da</i>	packed cell volume <i>PCV</i>
degrees of freedom (statistics) <i>d.f.</i>	parts per million <i>p.p.m.</i>
deoxyribonucleic acid <i>DNA</i>	pascal <i>Pa</i>
copy <i>cDNA</i>	periodic acid-Schiff reagent <i>PAS</i>
recombinant <i>recDNA</i>	phosphate buffered saline <i>PBS</i>
	polyacrylamide gel electrophoresis <i>PAGE</i>
electron microscopy <i>EM</i>	polymerase chain reaction <i>PCR</i>
enzyme-linked immunosorbent assay <i>ELISA</i>	post-infection <i>p.i.</i>
enzyme unit (international) <i>U</i>	probability (significance level) <i>P</i>
ethylenediaminetetra-acetic acid <i>EDTA</i>	
excretory/secretory <i>ES</i>	radioimmunoassay <i>RIA</i>
	relative humidity <i>r.h.</i>
foetal bovine serum <i>FBS</i>	relative mobility (electrophoresis) <i>M</i> , <i>M_x</i>
foetal calf serum <i>FCS</i>	reverse transcriptase <i>PCR</i> <i>RT-PCR</i>
Freund's complete adjuvant <i>FCA</i>	ribonucleic acid <i>RNA</i>
	messenger <i>mRNA</i>
gram <i>g</i>	mitochondrial <i>mtRNA</i>
gravitational field (centrifuging) <i>g</i>	nuclear <i>nRNA</i>
	ribosomal <i>rRNA</i>
haematoxylin and eosin <i>H & E</i>	small subunit <i>ssrRNA</i>
haemoglobin <i>Hb</i>	large subunit <i>lSrRNA</i>
hertz <i>Hz</i>	transfer <i>tRNA</i>
high-performance liquid chromatography <i>HPLC</i>	
hour <i>h</i>	scanning EM <i>SEM</i>
	second (time) <i>s</i>
immunoglobulins <i>IgA</i> , <i>IgD</i> , <i>IgE</i> , <i>IgG</i> , <i>IgM</i>	sodium dodecyl sulphate - <i>PAGE</i> <i>SDS-PAGE</i>
indirect immunofluorescence antibody test <i>IFAT</i>	species (singular/plural) <i>sp.</i> / <i>spp.</i>
infrared <i>i.r.</i>	specific gravity <i>sp. gr.</i>
interferon γ <i>IFNγ</i>	standard deviation <i>S.D.</i>
interleukin <i>IL</i> (<i>IL1</i> , <i>IL2</i> etc)	standard error of the mean <i>S.E.M.</i>
international unit <i>i.u.</i>	Student's <i>t</i> (statistics) <i>t</i>
intramuscular <i>i.m.</i>	subcutaneous <i>s.c.</i>
intraperitoneal <i>i.p.</i>	sum (statistics) Σ
intravenous <i>i.v.</i>	
isoelectric point <i>pl</i>	transmission EM <i>TEM</i>
	tumour necrosis factor <i>TNF</i>
joule <i>J</i>	
	ultraviolet <i>u.v.</i>
larval stages (nematodes) <i>L1</i> , <i>L2</i> etc	
litre <i>L</i>	volt <i>V</i>
	volumes (abbrev after number) <i>vol.</i>
mega (prefix) <i>M</i>	volume per volume <i>v/v</i>
metre <i>m</i>	
minute (time) <i>min</i>	watt <i>W</i>

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA