

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
CURSO DE BIOMEDICINA**

CYNARA MARQUES DE ALMEIDA

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE GRÂNULOS DENSOS
GRA6 E GRA7 DE *Toxoplasma gondii***

SÃO PAULO

2013

CYNARA MARQUES DE ALMEIDA

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE GRÂNULOS DENSOS
GRA6 E GRA7 DE *Toxoplasma gondii***

Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do título de bacharel em Biomedicina – modalidade médica da Universidade de Santo Amaro, sob a orientação da Profa. Dra. Luciana R. Meireles Jaguaribe Ekman e Co-orientação de Carolina Guilherme PrestesBeyrodt de Amorim.

**SÃO PAULO
2013**

CYNARA MARQUES DE ALMEIDA

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO PEPTÍDEOS
SINTÉTICOS DERIVADOS DE GRÂNULOS DENSOS GRA6 E GRA7 DE
*Toxoplasma gondii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de Bacharel
em biomedicina do Curso de Biomedicina da Universidade de Santo Amaro.

Data de Aprovação ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Doutora
Universidade de São Paulo – USP

Prof^a. Dr^a Carolina Guilherme Prestes Beyrodt de Amorim
Doutora
Universidade de Santo Amaro

Prof^a. Juliana Nunes Mecca
Mestre
Supervisão de Vigilância em Saúde (SUVIS)
Prefeitura Municipal de São Paulo

Dedico este trabalho a minha mãe Cacilda Marques de Almeida, que sempre me incentivou e me apoiou nesta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman, cuja orientação foi de extrema importância para alcançar meus objetivos.

A co-orientadora Prof. Dra. Carolina Guilherme Prestes Beyrodt de Amorim, pela disposição em participar da banca do trabalho de conclusão de curso.

A Juliana Nunes Mecca, por aceitar participar da banca do trabalho de conclusão de curso.

A minha mãe, por ter me dado forças para chegar até o final da graduação.

A minha família, pelo apoio.

A minhas amigas, em especial, Debora Araújo de Lima que me auxiliou no entendimento das matérias, Fernanda Haniuda que sempre estava disposta a me ouvir, Paloma SirigattiKnittel que sempre estava pronta a ajudar, Artemis Mendes da Silva por ter me ajudado grandemente no projeto da iniciação científica, Talita Caroline Coelho dos Santos, Elizama Carneiro Machado Bezerra e Marina Cortez Demichelique sempre me ajudaram no que fosse necessário.

Aos meus professores que ofereceram todos os seus conhecimentos.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia. O mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito curta para ser insignificante.”

Charlie Chaplin

RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose altamente prevalente, causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasita apicomplexa intracelular obrigatório, que acomete cerca de um bilhão de indivíduos no mundo e 70% da população adulta brasileira. A infecção é geralmente benigna e assintomática, mas pode afetar o homem através de perdas visuais, ou afecções graves e letais em fetos e pacientes imunossuprimidos. A ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo cistos viáveis do parasita, é uma das principais formas de transmissão da doença ao homem. Recentemente, casos severos de toxoplasmose humana devido a genótipos atípicos de *T.gondii* na América do Sul foram associados à ingestão de carne crua contaminada. No Brasil, estudos de genotipagem por PCR *multilocus* têm demonstrado alta diversidade genética de isolados humanos e animais, o que explicaria o maior potencial de virulência das cepas circulantes em nosso meio. Contudo, os métodos moleculares utilizados na maioria destes estudos necessitam de isolamento prévio do agente em camundongos, podendo induzir seleção de cepas virulentas. Uma alternativa seria a abordagem sorológica, utilizando peptídeos polimórficos sintéticos específicos para cada genótipo. Isto permitiria a identificação da cepa infectante a partir da resposta imune do hospedeiro. Neste projeto, avaliamos a viabilidade da tipagem das cepas de *T. gondii* por ELISA com peptídeos sintéticos em amostras de soros de animais de produção como bovinos, ovinos e caprinos. O ensaio apresentou melhores resultados para as amostras de ovinos e caprinos, sugerindo que a infecção destes animais ocorreu por cepas do tipo III. Para as amostras de bovinos a capacidade de identificação da cepa infectante foi menor. Nossos dados mostram que a sorotipagem é uma ferramenta útil para estudos epidemiológicos, possibilitando a seleção de cepas viáveis para imunização de rebanhos destinados ao consumo humano, porém o método de ELISA precisa de refinamentos, principalmente em relação à seleção dos peptídeos específicos para as cepas brasileiras.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, Sorotipagem, Peptídeos, Toxoplasmose.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease highly prevalent caused by *Toxoplasma gondii*, Apicomplexa obligate intracellular parasite that affects approximately one billion people worldwide and 70% of Brazilian adults. The infection is usually benign and asymptomatic, but it can affect humans causing visual loss or severe and lethal diseases in fetuses and immunosuppressed patients. The ingestion of raw or undercooked meat containing viable cysts of the parasite is one of the main forms of transmission of this disease to humans. Recently, severe cases of human toxoplasmosis due to atypical genotypes of *T. gondii* in South America have been associated with the ingestion of contaminated raw meat. In Brazil, studies of genotyping using multilocus PCR have demonstrated high genetic diversity of animal and human isolates, which would explain the higher virulence potential of strains circulating in our country, but the molecular methods used in these studies require the prior isolation of the agent in mice and can induce the selection of virulent strains. An alternative approach would be a serological test using synthetic peptides, which must be specific to each polymorphic genotype, and therefore would allow the identification of strains considering the immune response of infected animals. In this project, we evaluated the feasibility of strains typing of *T. gondii* by ELISA with synthetic peptides in serum samples from farm animals such as cattle, sheep and goats. The test showed better results for the samples of sheep and goats, suggesting that the infection of these animals was caused by type III strains. As for the samples of cattle, the identification ability of the infecting strain was lower. Our data show that serotyping is a useful tool for epidemiological studies, allowing the selection of strains likely to be used in programs of vaccination of farm animals for human consumption. However, the ELISA method needs refinement, particularly in relation to the selection of peptides that should contain specific sequences for Brazilian strains.

Keyword: *Toxoplasma*, Serotyping, Peptides, Toxoplasmosis.

Lista de ilustrações

Figura 1 -	Representação do ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	16
Figura 2 -	Resultados do ELISA para detecção de anticorpos G específicos em amostras de soro bovino, utilizando extrato proteico de <i>T.gondii</i>	46
Figura 3 -	Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro caprino, utilizando extrato proteico de <i>T.gondii</i>	47
Figura 4 -	Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro ovino, utilizando extrato proteico de <i>T.gondii</i>	47
Figura 5 -	Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de camundongos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	48
Figura 6 -	Resultados dos ensaios de reprodutibilidade intra interteste para amostras de soros de camundongos infectados com cepas geneticamente distintas de <i>T.gondii</i> , utilizando peptídeos sintéticos cepa específicos.....	50
Figura 7 -	Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de bovinos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	51
Figura 8 -	Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de caprinos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	52
Figura 9 -	Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de ovinos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	53

Lista de abreviatura e/ou siglas

<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasmagondii</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
NM	Nanômetros
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
MHz	Mega hertz
M	Molar
mg	Miligrama

Lista de símbolos

° C	Graus Celsius
µL	Microlitros
%	Porcentagem
mL	Mililitro
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Histórico.....	14
1.2	Taxonomia e características do parasita.....	14
1.3	Ciclo de vida.....	15
1.4	Transmissão.....	17
1.4.1	Transmissão por oocistos.....	18
1.4.2	Transmissão por cistos.....	21
1.5	Prevalência de infecção por <i>T.gondii</i> em animais de produção.....	22
1.6	Risco de transmissão de <i>T.gondii</i> em diferentes tipos de carnes.....	24
1.6.1	Carne suína.....	24
1.6.2	Carne ovina e caprina.....	26
1.6.3	Carne bovina.....	26
1.6.4	Carne de aves e ovos.....	27
1.7	Transmissão pela ingestão de carnes de outros animais.....	27
1.8	Toxoplasmose humana.....	27
1.9	Toxoplasmose animal.....	29
1.10	Aspectos epidemiológicos.....	32
1.11	Formas clínicas da toxoplasmose.....	33
1.11.1	Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes.....	33

1.11.2	Toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos.....	33
1.11.3	Toxoplasmose congênita.....	34
1.11.4	Toxoplasmose ocular.....	35
1.12	Diagnóstico.....	35
1.12.1	Sabin – test dye Feldman.....	36
1.12.2	Teste de aglutinação direta.....	36
1.12.3	Teste de aglutinação em látex e teste de aglutinação indireta.....	36
1.12.4	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	37
1.12.5	Ensaio Imunoenzimático (EIA).....	37
1.12.6	Teste de avidéz de IgG.....	38
1.12.7	Aglutinação por Imunoabsorção (ISAGA).....	38
1.12.8	Western Blotting.....	38
1.13	Profilaxia.....	39
2	OBJETIVO	40
2.1	Geral.....	40
2.2	Específico.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Parasitas.....	41
3.1.1	Cepa RH (tipo I).....	41
3.1.2	Cepa ME49 (tipo II).....	41
3.1.3	Cepa VEG (tipo III).....	41

3.2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	42
3.2.1	Detecção de anticorpos IgG específicos utilizando extrato proteico de <i>T.gondii</i>	42
3.2.1.1	Preparação e quantificação do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	42
3.2.1.2	Descrição da técnica.....	42
3.2.2	Detecção de anticorpos IgG específicos utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	43
3.2.2.1	Peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	43
3.2.2.2	Enzyme-Linked-Immunosorbent (ELISA) com peptídeos sintéticos cepa- específicos.....	44
3.3	Análise Estatística.....	44
4	RESULTADOS	46
4.1	Detecção de anticorpos IgG específicos utilizando extrato proteico de <i>T.gondii</i>	46
4.2	Padronização da reação de ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	47
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÃO	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Os primeiros achados do parasita foram observados em tecidos de aves e mamíferos e a primeira descrição do *T. gondii* foi feita em 1908 a partir de estudos em roedores. Sua importância médica ocorreu em 1939, quando foi identificado em uma criança infectada congenitamente. A importância veterinária tornou-se conhecida em 1970 com surtos de abortos em ovelhas. Neste mesmo ano seu ciclo de vida foi descrito através da descoberta que os felinos eram os hospedeiros definitivos e excretavam oocistos infectantes pelas fezes, causando contaminação no ambiente (Tenter et al, 2000; Dubey, JP 2008).

Sabin em 1948 confirmou que os isolados encontrados em humanos eram idênticos aos de animais, desta forma, concluindo que se tratava da mesma espécie (Dubey, JP 2008).

1.2 Taxonomia e característica do parasita

T. gondii é um parasita intracelular que pertencem ao Filo apicomplexa, Classe *Sporozoa*, Subclasse *Coccidiasina*, Família *Toxoplasmatidae* e gênero *Toxoplasma* (Hill, Chirukandoth, Dubey, 2005).

O taquizoíta de *T. gondii* é uma célula alongada, apresentando a região anterior afilada e a região posterior arredondada. Mede aproximadamente 8µm de comprimento por 2µm de largura. Na região anterior ou apical estão localizados os anéis polares, o conóide, as róptrias e os micronemas, estruturas que formam o complexo apical. O núcleo situa-se na região mediana e acima deste dispõem-se o complexo de Golgi e o apicoplasto. Compondo o envoltório nuclear e ramificando-se pelo citossol, estão presentes elementos do retículo endoplasmático. A mitocôndria é única e ramificada. Os grânulos densos e grânulos de amilopectina estão presentes em número e localização variáveis. O conjunto é envolvido pela película e, abaixo desta, partindo do anel polar posterior, irradiam-se os microtúbulos subpeliculares que percorrem o corpo celular no eixo longitudinal até cerca de dois terços de sua extensão (Souza, W et al, 2010).

Os bradizoítos possuem núcleo situado na extremidade posterior, são mais delgados e mais susceptíveis à destruição por enzimas proteolíticas (Hill, Chirukandoth, Dubey, 2005).

Os oocistos são produzidos nas células intestinais dos felinos, possuem uma forma oval, no seu interior contém 2 esporocistos, cada um com 4 esporozoítos (Remington et al., 2011).

1.3 Ciclo de vida

T. gondii possui um ciclo de vida heteroxeno e apresenta uma fase assexuada que ocorre nos hospedeiros intermediários, sendo animais e humanos, e uma fase sexuada que ocorre nos hospedeiros definitivos, sendo unicamente da família dos felídeos (Souza, W et al, 2010). A reprodução sexuada ocorre em felinos após a ingestão de cistos presentes nos hospedeiros intermediários, que neste caso são suas presas. Os gatos começam a liberar oocistos de 3 a 7 dias após a ingestão de cistos e este processo de eliminação pode durar até 20 dias, desta forma, podem eliminar cerca de 360 milhões de oocistos em um dia, sendo extremamente resistentes às influências do meio ambiente, podendo esporular e sobreviver na água do mar por vários meses (Florence e Darde, 2012). A reprodução assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários após a ingestão de oocistos (Florence e Darde, 2012). Ao longo do ciclo o *T. gondii* apresenta três formas infecciosas: taquizoítos, bradizoítos (em cistos teciduais) e os esporozoítos (em oocistos) (Remington et al., 2011).

Os taquizoítos possuem alta taxa proliferativa, o que propicia sua disseminação no hospedeiro, caracterizando a fase aguda da doença, enquanto os cistos teciduais, repletos de bradizoítos, persistem por longo tempo, às vezes, a vida toda do hospedeiro, caracterizando a fase crônica (Ferreira et al., 2003). Os taquizoítos entram na célula hospedeira por penetração ativa, e permanecem protegidos do sistema imune do hospedeiro no interior do vacúolo parasitóforo. Neste local, dividem-se por endodiogenia dando origem ao pseudocisto. Após várias divisões, a célula hospedeira se rompe liberando taquizoítos que irão invadir as células adjacentes. Na vigência da resposta imune, principalmente presença de INF- γ , o *T. gondii* forma cistos, contendo bradizoítos (Hill, Chirukandoth, Dubey, 2005).

A partir de 7 a 10 dias após a infecção, os bradizoítos se multiplicam lentamente nos cistos, deste modo, os cistos se formam principalmente no cérebro, musculatura cardíaca e esquelética e olhos. No entanto, também podem ser encontrados em rins, pulmões e fígado (Souza, W et al, 2010; Florence e Darde, 2012; Hill, Chirukandoth e Dubey, 2005).

Os oocistos são formados apenas nos felinos e são resistentes no meio ambiente. Os gatos eliminam oocistos após a ingestão de qualquer estágio do parasita. Estes se tornam esporulados dentro de 1 a 5 dias, dependendo das condições climáticas do ambiente. Os oocistos esporulados contém 2 esporocistos, cada um com 4 esporozoítos (Hill; Chirukandoth, Dubey, 2005).

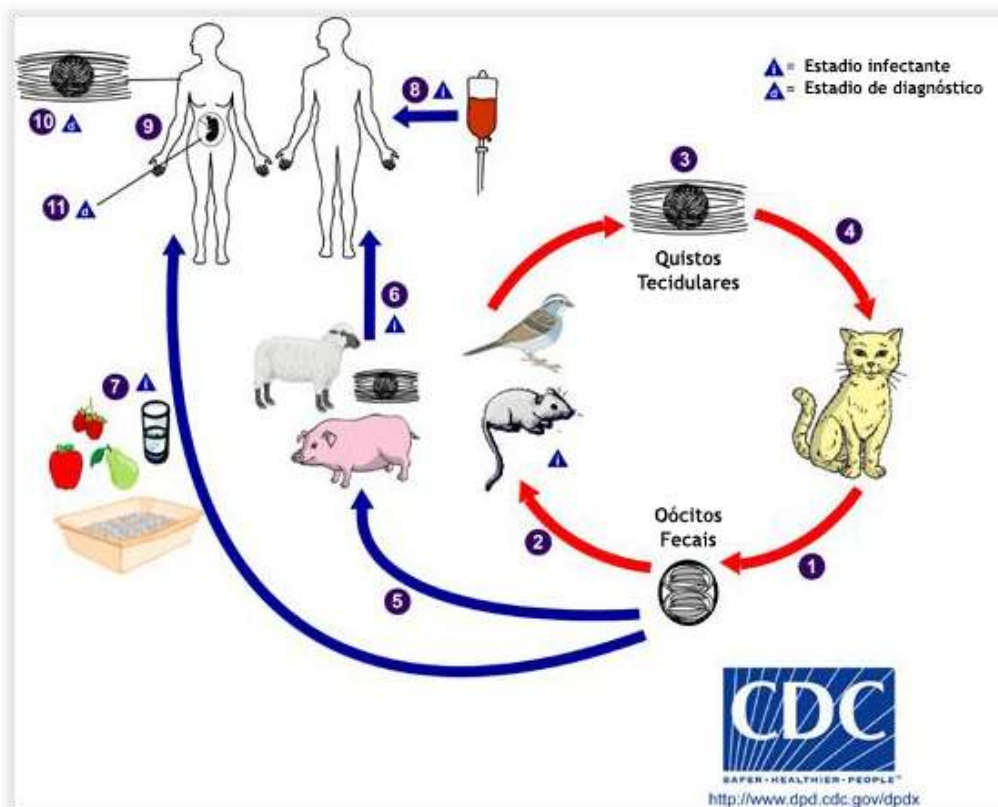


Figura 1 - Ciclo de vida do *T. gondii*

Fonte: http://www.simpodium.pt:81/simpodium.vet/Outrosconteudos/ConteudosSimpodiumDetails?pk_cont=122&indexheader=4

Acesso: 15/05/2013 às 22:20

1.4 Transmissão

O mecanismo de transmissão de *T. gondii* permaneceu desconhecido até o seu ciclo de vida ser elucidado em 1970. Basicamente, a transmissão da infecção pelo *T.gondii* no homem ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos, e pela ingestão de cistos presentes na carne crua ou mal cozida. Entretanto, tem sido relatada transmissão por transplantes de órgãos, em especial, o de coração, medula óssea, rins e fígado; por transfusões de sangue e derivados e por acidentes laboratoriais (Remington et al., 2011). Merece grande destaque ainda, a transmissão transplacentária, que ocorre durante a primoinfecção aguda materna, responsável pelas sequelas, características da toxoplasmose congênita que atinge fetos (Remington et al., 2011).

O carnivorismo é considerado uma das principais formas de transmissão do *T.gondii* na natureza, sendo responsável pelas altas taxas de infecção no homem e animais em todo o mundo (Dubey, JP 2008). Os primeiros relatos da importância da carne na transmissão da toxoplasmose foram feitos por Weinman e Chandler (1954). Jacobs, Remington e Melton (1960) forneceram evidências para apoiar esta hipótese, demonstrando a resistência dos cistos de *T. gondii* às enzimas proteolíticas. Estes autores demonstraram que a parede do cisto era imediatamente dissolvida por tais enzimas, mas os bradizoítos liberados sobreviviam o suficiente para infectar o hospedeiro. A hipótese de transmissão através da ingestão de carne contaminada foi testada experimentalmente por Desmonts et al. (1965) em um experimento com crianças em um sanatório em Paris. Estes autores compararam as taxas de aquisição de infecção por *T. gondii* em crianças antes e após a admissão no sanatório. A taxa de 10% de infecção anual de *T. gondii* aumentou para 50% após a adição de carne bovina ou carne de cavalo mal cozidas na dieta diária. A taxa de infecção anual alcançou 100% após a adição de costeletas de cordeiro mal cozidas na dieta. Como a prevalência de *T. gondii* é muito maior em ovinos do que em equinos ou bovinos, este fato ilustrou a importância do carnivorismo na transmissão de *T. gondii*. Esta forma de transmissão é comum em humanos em algumas localidades, onde a carne crua é rotineiramente consumida (Desmonts et al., 1965; Dubey, JP 2008). Kean et al. (1969) descreveram a toxoplasmose em um grupo de estudantes de medicina que consumiram hambúrgueres mal cozidos.

A transmissão congênita e o carnivorismo podem explicar alguns modos de transmissão de *T. gondii*, mas não explicam a infecção generalizada em vegetarianos e herbívoros. A infecciosidade de *T. gondii* associada a fezes de gato foi descoberta pela primeira vez por Hutchison (1965), mas somente em 1970 foi elucidado o ciclo de vida do *T. gondii* pela descoberta da fase sexual do parasita no intestino delgado do gato (Dubey e Frenkel, 1972). Das muitas espécies de animais infectados experimentalmente com *T. gondii*, só os felinos excretam oocistos do agente (Dubey e Frenkel, 1972). Os oocistos no meio ambiente têm causado vários surtos da doença em seres humanos pela transmissão fecal-oral (Teutsch et al. 1979; Benenson et al., 1982; Bowie et al. 1997; Moura et al., 2006). Estudos soropidemiológicos em ilhas isoladas no Pacífico (Wallace, 1969), Austrália (Munday, 1972), e nos Estados Unidos (Dubey et al., 1997) demonstraram uma ausência de *T. gondii* em ilhas sem gatos, confirmando o importante papel do gato na transmissão natural de *T. gondii*. A vacinação de gatos com uma cepa mutante viva de *T. gondii* em granjas de suínos nos Estados Unidos reduziu a transmissão da infecção pelo *T. gondii* em camundongos e porcos (Mateus- Pinilla et al., 1999), apoiando assim, o papel do gato na transmissão natural de *T. gondii*.

Contudo, a determinação das fontes de infecção é tecnicamente difícil, porque no momento em que a infecção pelo *T. gondii* é diagnosticada, a fonte original da infecção pode não estar mais presente. Além disso, a maioria das informações contidas nos estudos é dependente do tipo de pergunta e resposta obtidas no inquérito epidemiológico. É interessante notar que o ambiente, em muitas áreas no Brasil, é altamente contaminado por oocistos, e, portanto, é difícil localizar todas as fontes de infecção.

1.4.1 Transmissão por oocistos

Os felinos (domésticos e selvagens) são os únicos animais que podem excretar oocistos de *T. gondii* nas fezes. Um gato pode excretar milhões de oocistos, que podem sobreviver no meio ambiente por meses, dependendo da umidade e temperatura (Dubey, 2010). Gatos peridomiciliados são abundantes em locais públicos no Brasil, mas se sabe relativamente pouco sobre a prevalência de *T. gondii* em gatos no Brasil, sendo que a maioria dos inquéritos descritos na literatura foi realizada no Estado de São Paulo (Sorgob et al., 1972; Lucas et al., 1999; Silva

et al., 2002; Meireles et al., 2004; Pena et al., 2006; Bresciani et al., 2007; Coelho et al., 2011). Estes estudos mostram que a soroprevalência é baixa em gatos amostrados em clínicas, já que são, provavelmente, animais de estimação que recebem alimentos processados, sem exposição a fatores de risco (Dubey et al., 2012). No estudo relatado por Pena et al. (2006) foram avaliados 237 gatos errantes, capturados em 15 municípios do Estado de São Paulo em 2003, com um número equivalente de machos e fêmeas (118 machos, 119 fêmeas). Anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em 84 (35,4%) de 237 gatos. Tecidos de 71 gatos soropositivos foram inoculados em camundongos para bioensaio e *T. gondii* viável foi isolado em 66,2% (47 gatos).

Durante o estudo epidemiológico de um surto de transmissão hídrica em Santa Isabel do Ivaí, Paraná, amostras de 58 gatos adultos foram obtidas de 51 casas naquela cidade (Lehmann et al., 2004). Todos os gatos foram testados sorologicamente, bem como por bioensaio, independentemente da sua resposta sorológica. Anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em 49 (84,4%) dos 58 gatos e *T. gondii* viável foi isolado em 37 de 54 (68,5%) gatos. Este estudo indicou que mais de 80% das casas nesta área tinham um gato infectado por *T. gondii*. Os gatos começam a excretar oocistos de *T.gondii* nas fezes cerca de 10 dias após a ingestão de cistos teciduais e eliminam o parasita durante 1-2 semanas (Dubey e Frenkel, 1972). Durante o período de excreção de oocistos, os gatos raramente adoecem e não possuem anticorpos contra *T.gondii* (Meireles et al., 2008; Dubey et al., 2012). Assim, é uma suposição razoável de que a maioria dos gatos soropositivos já excretou oocistos (Meireles et al., 2008; Dubey e Prowell., 2012), portanto, para estudos epidemiológicos, os dados de soroprevalência são mais significativos do que a detecção de oocistos nas fezes. Além disso, alguns autores relatam que somente em 1% das fezes de gatos examinadas são encontrados oocistos de *T.gondii* (Dubey, 2010). Este baixo índice de positividade fecal de oocistos também foi exemplificado no trabalho de Pena et al. (2006), no qual oocistos de *T. gondii* foram encontrados nas fezes de apenas 3 (1,2%) dos 237 gatos. Os primeiros relatos de toxoplasmose em felinos no Brasil, também indicam uma baixa prevalência de oocistos de *T. gondii* em fezes de gato (Barbosa et al. 1973; Nery-Guimarães e Lage 1973; do Amaral et al. 1976; Ogassawara et al. 1980; Chaplin et al. 1991). Além dos gatos domésticos, os felinos selvagens também podem excretar oocistos (Dubey e Prowell., 2012).

Oocistos de *Toxoplasma gondii* foram demonstrados em fezes de várias espécies de felídeos selvagens, natural e experimentalmente infectados (Dubey, 2010). Levantamentos epidemiológicos, especialmente em crianças na pré-adolescência, demonstram que o ambiente é altamente contaminado com oocistos, especialmente em comunidades com piores condições sócio-econômicas (Dubey et al., 2012). Dos Santos et al. (2010) encontraram oocistos de *T. gondii* em 7 de 31 amostras de solo de *playgrounds* de escolas públicas da região noroeste do Estado de São Paulo. Esta é uma taxa alta de contaminação do solo por oocistos de *T. gondii*. (Coutinho SG, Lobo R e Dutra G, 1982) também encontraram *T. gondii* em amostras de solo de uma fazenda, onde um surto de *T. gondii* havia ocorrido. Em estudos anteriores, em Porto Alegre, RS, Chaplin et al. (1991) detectaram oocistos de *Toxoplasma* em fezes de 13 dos 15 gatos jovens examinados e Braccini et al. (1992) relataram oocistos em fezes de 5 de 25 animais. No entanto, o diagnóstico microscópico não foi confirmado por bioensaios em camundongos. A água potável pode ser facilmente contaminada com oocistos (Bahia- Oliveira et al., 2003). Tecnicamente, é difícil encontrar oocistos de *T. gondii* em água, porque o número de oocistos em água é baixo devido ao fator de diluição (de Moura et al., 2006). Outra abordagem epidemiológica para avaliar a contaminação solo por oocistos consiste na determinação da prevalência de *T. gondii* em animais que se alimentam no solo. Assim, vários autores têm utilizado galinhas de criação extensiva (*Gallus domesticus*) para esta finalidade. Os objetivos são determinar a prevalência de infecção por *T. gondii* em galinhas e isolar formas viáveis do parasita para avaliação da diversidade genética dos isolados. Estes estudos também têm sido realizados em animais selvagens (Dubey et al., 2012). Além de indicadores de contaminação do solo os frangos infectados representam também uma fonte de infecção para gatos e possivelmente para humanos, já que estes animais são frequentemente abatidos em casa e as vísceras, muitas vezes, não são devidamente eliminadas. A carne de frango, geralmente, é consumida bem cozida, porém os hábitos de higiene durante o processamento culinário podem interferir diretamente na qualidade do alimento que pode ser uma fonte de infecção humana (Dubey et al., 2012).

Um grande número de felinos selvagens, procedentes de parques zoológicos e centros de melhoramento no Brasil apresentou anticorpos para *T. gondii* (Dubey et al., 2012). Pena et al. (2011) isolaram formas viáveis de *T. gondii* em musculatura esquelética de um jaguarundi de cativeiro que morreu de trauma. Não há nenhuma

informação sobre a prevalência do *T. gondii* em felinos selvagens de vida livre no Brasil (Dubey et al., 2012). A alta soropositividade em felinos selvagens em cativeiro sugere que eles já tenham eliminado oocistos nas fezes e contaminado o ambiente do zoológico. Em ameríndios isolados no Mato Grosso, 80,4% dos 148 indivíduos pesquisados apresentaram anticorpos contra *T. gondii* (Amendoeira et al., 2003). Esses indivíduos viviam em uma grande área com pouco contato com não índios. Além disso, não possuíam gatos de estimação, e também não comiam carne. Esta população se alimentava de insetos e produtos hortícolas, incluindo cogumelos. Os autores sugerem que a excreção de oocistos de *T. gondii* por felinos selvagens poderia ser o fator responsável pela contaminação do solo e da vegetação da área. Um estudo realizado com 95 botos do rio Amazonas mostrou que 86,3% dos animais foram soropositivos para *T. gondii*. Como estes animais são piscívoros a fonte mais provável de infecção seria a ingestão de águas contaminadas do rio com oocistos de felinos selvagens, já que gatos domésticos não estão presentes neste ambiente (Dubey et al., 2012).

1.4.2 Transmissão por cistos

Milhões de animais são abatidos anualmente para consumo humano no Brasil e inquéritos sorológicos indicam que até 90% dos animais domésticos e selvagens apresentam anticorpos contra *T. gondii* (Dubey et al., 2012). Além de causar prejuízos à pecuária, a toxoplasmose nestes animais, tem grande impacto também sobre a saúde humana, visto que o animal infectado pode manter cistos teciduais durante longos períodos e que desta forma, o consumo da carne crua ou mal cozida pode levar à infecção humana. Formas viáveis de *T. gondii* já foram isoladas em uma ampla variedade de animais no Brasil (Dubey et al., 2012), mas estes estudos, ainda são restritos, devido ao fato de envolverem técnicas moleculares onerosas e/ou métodos de bioensaio com longo tempo de execução. Recentemente, foi proposta a utilização do exsudato cárneo como material biológico para detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* por ELISA em cortes comerciais de carne. Esta abordagem é uma ferramenta importante para controle e monitoramento da carne destinada ao consumo humano, já que permite automação e aplicação em larga escala (Mecca, Meireles, e Andrade, 2011).

1.5 Prevalência de infecção por *T.gondii* em animais de produção

1.5.1 Suínos

A taxa de soroprevalência em suínos no Brasil é de até 90% (Dubey et al., 2012) e parasitas viáveis têm sido isolados a partir de tecidos de suínos em diferentes regiões do Brasil (Dubey et al., 2012). Jamra et al. (1969) testou 83 amostras de carne de porco obtidas em açougues e supermercados na cidade de São Paulo, sendo que 5 amostras apresentaram formas viáveis de *T. gondii*. Na mesma época, Amaral e Macruz (1968) detectou *T. gondii* viável em 8 de 25 diafragmas de animais de São Paulo. Frazão-Teixeira et al. (2006, 2011) isolaram *T. gondii* viável a partir de amostras de cérebro e coração de suínos comercializados em açougues em Campos dos Goytacazes, RJ. Bezerra et al. (2012) isolaram, por bioensaio, formas viáveis de *T. gondii* em cérebro e língua de 5 em um total de 20 cabeças de suínos provenientes de pequenas granjas e açougues em Ilhéus, Bahia. Dos Santos et al. (2005) testaram 286 porcos com 6-8 meses de idade, provenientes de 17 fazendas em Jaboticabal, SP. Destes, 49 (17%) foram seropositivos por MAT. Os tecidos foram coletados para bioensaio quando os animais foram abatidos. *T. gondii* viável foi isolado de tecidos de 7 suínos.

1.5.2 Ovinos

A taxa de soroprevalência em ovinos no Brasil é de até 59% (Dubey et al., 2012) e parasitas viáveis foram isolados em tecidos de animais abatidos para consumo humano (Dubey et al., 2012). Spósito Filha et al. (1992) relataram o isolamento de *T. gondii* em diafragmas de 20 em um total de 136 ovelhas no Estado do Rio Grande do Sul. A identificação de 5 destes isolados foi baseada na busca de cistos teciduais em esfregaços de cérebros de camundongos inoculados com tecidos de ovinos. Nos 15 casos restantes, cistos teciduais foram identificados apenas por hematoxilina – eosina em cortes histológicos de cérebros de camundongos. Da Silva e Langoni (2001) isolaram *T. gondii* a partir de tecidos de 34 de 40 ovelhas soropositivas. No entanto, a maioria dos dados foi baseada na detecção de anticorpos anti - *T. gondii* em soros de camundongos inoculados com tecidos dos ovinos. Ragozo et al. (2008) avaliaram sorologicamente 495 ovelhas de

36 municípios do Estado de São Paulo e anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em 24,2% das ovelhas, sendo que soropositividade estava presente em ovinos de todos os municípios. *T. gondii* viável foi isolado por bioensaio em 16 de 82 ovinos soropositivos. Recentemente, da Silva et al. (2011) detectaram anticorpos anti - *T. gondii* em 66 (11%) de 602 ovelhas no Estado de São Paulo. Estes ovinos eram provenientes do RS e SP, sendo que 51 (11,8%) de 430 ovinos de RS e 15 (8,7%) de 172 ovinos de SP foram soropositivos. *T. gondii* foi isolado por bioensaios em camundongos em 20 de 66 ovinos soropositivos (15 de 51 do RS e 5 de 15 de SP). Quinze destes 20 isolados eram de ovinos do Estado do Rio Grande do Sul e 5 eram de ovinos do Estado de São Paulo.

1.5.3 Caprinos

A taxa de soroprevalência em caprinos no Brasil é de até 92% (Dubey et al., 2012) e parasitas viáveis foram isolados em tecidos de animais abatidos para consumo humano (Dubey et al., 2012). Spósito Filha et al. (1983) isolaram *T. gondii* em diafragma de 3 em um total de 95 cabras de São Paulo. Cavalcante et al. (2007) isolaram *T. gondii* de amostras de coração de 2 em um total de 169 caprinos do Ceará. Silva et al. (2009) detectaram DNA de *T. gondii* em 8 de 102 tecidos de caprinos da Bahia. Ragozo et al. (2009) tiveram melhor sucesso no isolamento de formas viáveis de *T. gondii*. Neste estudo foram testados 143 caprinos e anticorpos contra *T. gondii* foram detectados em 41 (35,9%) de 114 caprinos do Estado de São Paulo, 5 (26,3%) de 19 caprinos do estado do Rio Grande do Norte, mas não foram detectados anticorpos em 10 caprinos do Estado da Bahia. Tecidos de 26 desses 46 caprinos soropositivos foram bioensaios em camundongos e *T. gondii* foi isolado em 12 amostras.

1.5.4 Bovinos

A taxa de infecção nos bovinos no Brasil é de até 49,4% (Frazão-Teixeira et al., 2011). Segundo Dubey et al. (2012), a alta soroprevalência de *T. gondii* em bovinos no Brasil é intrigante, já que formas viáveis de *T. gondii* têm sido raramente isoladas em amostras de carne bovina em todo o mundo, incluindo o Brasil. *T. gondii* não foi isolado em 98 amostras de carne bovina de São Paulo (Jamra et al., 1969), e

98 diafragmas de Belo Horizonte, MG (Passos et al., 1984). Recentemente, Costa et al. (2011) isolaram *T. gondii* em 3 de 50 fetos (cérebros de 2 e retina de 1) de 50 vacas abatidas em Jaboticabal, SP.

1.5.5 Equinos

T. gondii não foi isolado em diafragmas de 23 cavalos no RS e SP, porém 4 destes animais foram soropositivos (Spósito Filha et al., 1986). Em geral, os cavalos não são um bom hospedeiro para *T. gondii* e a soropositividade é baixa em todo mundo (Dubey et al., 2012), entretanto Vidotto et al. (1997) detectaram uma taxa de soropositividade de 31,6% em 561 abatidos em Apucarana, Paraná.

1.5.6 Roedores

A prevalência de formas viáveis de *T. gondii* nestes animais é importante, pois servem como fontes de infecção para os seres humanos e outros animais (Dubey et al., 2012).

A capivara (*Hydrochoeris hydrochaeris*) é um grande roedor herbívoro muito prevalente no Brasil e sua carne é consumida pela população. Estes animais têm sido domesticados, mas também são comuns na natureza. Estudos brasileiros mostram que as taxas de anticorpos anti - *T. gondii* em capivaras variam entre 42-75% (Dubey et al., 2012) e o agente já foi isolado em uma percentagem elevada de animais soropositivos (Dubey et al., 2012).

1.6 Risco de transmissão de *T. gondii* em diferentes tipos de carnes

1.6.1 Carne suína

Entre os alimentos de origem animal, a carne suína, proveniente de animais infectados, é a fonte de carne mais provável de transmissão do *T. gondii* para o homem em muitos países, incluindo o Brasil (Dubey 2009; da Silva et al., 2010). A ingestão de embutidos caseiros tem sido considerada uma fonte de infecção pelo *T. gondii* no sul Brasil, particularmente em Erechim (Glasner et al., 1992b). Além de relatos de isolamento de formas viáveis de *T. gondii*, o DNA do agente tem sido

freqüentemente demonstrado na carne de porco no Brasil. Belfort-Neto et al. (2007) detectaram DNA de *T. gondii* em 34% de 50 diafragmas e 66% de 50 línguas de suínos de matadouros em Erechim. Da Silva et al. (2005) detectaram por PCR DNA de *T. gondii* em 19 de 70 salsichas de 55 estabelecimentos de São Paulo e Bezerra et al. (2012) detectaram DNA de *T. gondii* em amostras de cérebro de 11 e de língua de 9 suínos em um total de 20 animais de um açougue em Ilhéus, Bahia. Fernandes et al. (2012) encontraram DNA de *T. gondii* em 21 de 38 suínos soropositivos em Pernambuco. No entanto, a detecção de DNA não distingue parasitas vivos e mortos. Além disso, procedimentos como salga e cura, usados na fabricação de salsichas e outras preparações, nem sempre inativam os cistos teciduais, já que não há um procedimento universalmente padronizado (Dubey, 2010). Anualmente, são produzidos cerca de 32 milhões de suínos no Brasil, com um consumo de 2.220.000 toneladas de carne suína. Alguns autores sugerem que cortes comerciais de carne suína poderiam estar contaminados com *T. gondii* representando uma fonte importante de transmissão da toxoplasmose para muitas pessoas (Dubey et al., 1986; Tsutsui et al., 2007). Isto pode ser confirmado pelo surto que ocorreu em Santa Vitória do Palmar, RS, onde todos os membros de uma mesma família desenvolveram toxoplasmose clínica após o consumo de lingüiça suína crua em uma festa (de Almeida et al., 2006). As altas taxas de soroprevalência de *T. gondii* em suínos de pequenas propriedades do Brasil representam um sério problema de saúde pública (Dubey et al., 2012). da Silva et al. (2008) relataram uma taxa elevada de anticorpos anti - *T. gondii* (86% de 115 suínos) criados em pequenas propriedades da região oeste do Paraná. É importante ressaltar que medidas adequadas de higiene e controle de roedores e gatos em sistemas de criação intensiva de suínos reduzem consideravelmente as taxas de infecção por *T.gondii*, como descrito nos EUA por Dubey e Jones (2008). Em um estudo recente, anticorpos anti - *T. gondii* foram encontrados em 48% de 200 porcos de criação extensiva, sendo que esta taxa diminuiu acentuadamente chegando a zero em 300 amostras de suínos de criação intensiva, utilizando métodos idênticos de detecção (Villalobos et al., 2011).

1.6.2 Carne ovina e caprina

Não existem dados sobre a frequência do consumo de carne ovina mal cozida no Brasil. No entanto, um surto de toxoplasmose humana foi relacionado à ingestão de carne de cordeiro mal passada no Paraná (Bonametti et al., 1997). Os rebanhos ovinos e caprinos aumentaram consideravelmente nas últimas décadas no Brasil, e outra questão que deve ser ressaltada é a possibilidade de transmissão do *T.gondii* para o homem através da ingestão do leite cru de cabras lactentes infectadas. Chiari e Neves (1984) reportaram um surto de toxoplasmose adquirida através da ingestão de leite cru de cabra, envolvendo três membros de uma mesma família em Belo Horizonte, MG. Em um estudo com 72 cabras leiteiras, 25% foram soropositivas para *T.gondii* (Cavalcante et al., 2008).

1.6.3 Carne bovina

O papel dos bovinos e búfalos na transmissão de *T. gondii* é incerto porque parasitas viáveis raramente foram demonstrados em cortes comerciais de carne bovina (Santos et al., 2010). Bovinos e bubalinos são naturalmente resistente à infecção por *T. gondii* e há evidências de que alguns bovinos tornam-se soronegativos após infecção aparentemente bem sucedida (Dubey, 2010). Pouco se sabe sobre a especificidade e sensibilidade do diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. gondii* em bovinos porque vários testes que são utilizados para diagnóstico da toxoplasmose em outras espécies animais dão resultados controversos com amostras de soro bovino, e é difícil verificar a especificidade utilizando bovinos naturalmente infectados. A maior parte das pesquisas sorológicas em bovinos no Brasil foi realizada com IFA e nada se sabe sobre sua especificidade para detecção de anticorpos de *T. gondii* em bovinos cronicamente infectados (Dubey et al., 2012). Assim, não podemos afirmar com exatidão o significado zoonótico da soropositividade de 71% (IFA título 1:40) em 1420 bovinos relatado por Santos et al. (2009). Entre todos os testes sorológicos avaliados, um título de 1:100 no MAT parece ser indicativo de infecção por *T. gondii* em bovinos (Dubey, 2010).

1.6.4 Carne de aves e ovos

Ovos crus de galinha não são susceptíveis de ser uma fonte de infecção para os seres humanos (Dubey, 2010). Ovos crus não devem ser consumidos por seres humanos, não pelo risco de infecção por *T. gondii*, mas sim pela transmissão de salmonelose (Dubey et al., 2012). Em muitos casos, os frangos são abatidos em casa ou instalações sem serviços de inspeção veterinária de abate e as vísceras são deixadas para catadores ou são indevidamente descartadas. Infecção por *Toxoplasma gondii* pode ser transmitida caso as mãos não sejam lavadas após a manipulação da carne durante o seu preparo para consumo, no entanto, estudos de avaliação de risco não foram realizados. No Brasil, 12.000.000 toneladas de aves de corte são produzidas anualmente, mas há pouca informação sobre a prevalência de *T. gondii* em galinhas de granjas de criação intensiva. Em pequenas amostras de galinhas criadas comercialmente, *T. gondii* não foi detectado em 185 frangos nos estados de São Paulo (Meireles, Galisteo e Andrade, 2003) e em 80 frangos no Espírito Santo (Beltrame et al., 2012).

1.7 Transmissão pela ingestão de carnes de outros animais

A ingestão de carne mal cozida de coelhos, cavalo, capivaras, e animais de caça pode ser uma fonte de infecção (Kijlstra e Jongert, 2008). Anticorpos anti - *T. gondii* foram encontrados em muitas espécies de animais silvestres no Brasil (Dubey et al., 2012) e formas viáveis de *T. gondii* foram isoladas em alguns destes animais (Dubey et al., 2012). Toxoplasmose congênita foi diagnosticada em uma criança francesa que consumiu carne de cavalo crua importada do Brasil (Pomares et al., 2011).

1.8 Toxoplasmose humana

Com a descoberta do teste do corante (*Dye test*), por Sabin e Feldman (1948), foi possível a realização de inquéritos de base populacional para o estudo da prevalência da infecção por *T.gondii* em humanos. Dentre os vários estudos soroepidemiológicos que utilizaram esta metodologia, merecem destaque os trabalhos com recrutas militares brasileiros, já que os dados foram comparados com

os resultados obtidos para militares americanos (Feldman, 1965; Lamb e Feldman, 1968). Neste levantamento, os soros foram colhidos de homens adultos jovens (18-21 anos) no Brasil e nos EUA e as amostras de ambos os países foram depositados na Organização Mundial da Saúde (OMS) nos EUA, onde foram testadas de forma idêntica em dois laboratórios americanos, o laboratório do Dr. Feldman, co-inventor do teste do corante, e o Centro de Controle de Doenças (CDC), em Atlanta, Geórgia. Os resultados indicaram que a soroprevalência de *T. gondii* foi quatro vezes maior no Brasil (56%) do que nos EUA (13%), e a magnitude dos títulos de anticorpos foram também mais elevadas no Brasil do que nos EUA (Feldman, 1965; Lamb e Feldman, 1968; Dubey et al., 2012).

Os dados de prevalência sorológica em crianças no Brasil mostram uma positividade de 32% na faixa etária de 0-5 anos, 19,5% - 59% na faixa de 6-10 anos de idade, e 28,4 -84,5% em crianças com 11-15 anos (Dubey et al., 2012). Os dados indicam que em certas áreas do Brasil aproximadamente 50% dos adolescentes e das crianças têm sido expostos ao parasita (Dubey et al., 2012). Entre estes estudos, Jamra e Guimarães (1981) relataram dados de soroprevalência em 450 crianças, com idade entre 0-15 anos, a partir de um centro de saúde em São Paulo. As porcentagens de soropositivos foram: 53,3% em crianças <1 ano de idade, 0% em 2-3 anos de idade, 13,3% em 3-4 anos de idade, e 10% em 4-5 anos de idade, chegando a 43,3% com 15 anos de idade. Soropositividade em lactentes <1 ano de idade foi atribuída a anticorpos transferidos a partir da mãe infectada. Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* foram encontrados em 4 de 30 crianças (13,3%) com idade de 3-4 anos, mas não em crianças com idade de 2-3anos. Em ameríndios isolados de Mato Grosso, 6 de 12 crianças com 6-9 anos foram sororreagentes (Amendoeira et al., 2003). Altas taxas de soroprevalência (36 – 92%) têm sido descritas em mulheres grávidas. Estes dados indicam que a infecção por *T.gondii* em gestantes no Brasil é uma das maiores do mundo (Dubey et al., 2012).

1.9 Toxoplasmose animal

Com relação à toxoplasmose animal, nem sempre a protozoose causa sintomatologia evidente ou morte, mas muitas vezes ocorre de forma inaparente, dependendo dessas situações de muitos fatores, como a idade do animal, a via de inoculação, a espécie considerada e a virulência intrínseca da cepa (Tenter et al., 2000).

Entre os animais domésticos, esta doença ganha particular importância nas espécies suína, ovina e caprina, já que são mais suscetíveis à infecção que as demais espécies estudadas (Dubey e Kirkbride, 1989). O *T. gondii* é a principal causa de abortos em ovelhas e cabras (Dubey e Kirkbride, 1989; Buxton et al., 1991), sendo responsável por grandes perdas econômicas (Dubey e Beattie, 1988).

1.9.1 Cães

Toxoplasmose clínica é rara em cães (Dubey, 2010a). Na maioria dos casos toxoplasmose clínica é vista em cães imunossuprimidos, muitas vezes com infecção pelo vírus da cinomose (Dubey e Beattie, 1988).

Anticorpos contra *T. gondii* têm sido amplamente relatados em cães no Brasil (Dubey et al., 2012). Como estes animais tem uma estreita associação com os seres humanos são frequentemente utilizados em estudos epidemiológicos como indicadores de contaminação do meio ambiente com *T. gondii* (Meyreles et al., 2004). A alta prevalência de infecção por *T. gondii* em cães de rua sugere que a ingestão de presas infectadas é uma importante forma de transmissão do agente para estes animais nos centros urbanos (de Souza et al., 2003).

1.9.2 Ovinos e caprinos

A toxoplasmose é uma das principais causas de abortos em ovinos e caprinos em muitos países e isto tem sido descrito desde a década de 50 (Dubey e Beattie, 1988; Dubey, 2009a). No entanto, abortos por *T. gondii* foram relatados apenas recentemente em caprinos e fetos ovinos no Brasil (Pescador et al., 2007; de Moraes et al., 2011). Pescador et al. (2007) examinaram 6 fetos caprinos abortados no Rio Grande do Sul. *T. gondii* foi demonstrado por métodos de imuno-histoquímica

em vários tecidos de um feto com lesões degenerativas. Nos 5 outros casos, DNA de *T. gondii* foi encontrado nos tecidos dos caprinos.

Evidência presuntiva de aborto por *T. gondii* foi encontrada em 5 de 35 fetos de 30 ovelhas a partir de 5 fazendas no estado de Pernambuco. DNA de *T. gondii* foi detectado por PCR em vários órgãos e placentas, e as placentas apresentaram lesões necróticas. Silva e de la Rue (2006) também relataram possível transmissão congênita de *T. gondii* em cordeiros em uma fazenda no Rio Grande do Sul, mas não relataram a ocorrência de aborto.

1.9.3 Suínos

Toxoplasmose fatal foi relatada uma vez, no Brasil, em um leitão com 28 dias de em Belo Horizonte, MG (Lamas da Silva, 1959). Este animal tinha 4 irmãos que morreram antes, mas a etiologia não foi investigada. O leitão investigado teve diarreia, dispneia e febre. *T. gondii* foi identificado em cortes histológicos de pulmão, coração, fígado, e linfonodos mesentéricos.

1.9.4 Primatas não humanos

Macacos do Novo Mundo, em geral, são altamente suscetíveis para toxoplasmose clínica, enquanto que primatas do Velho Mundo são resistentes à toxoplasmose clínica. Nery-Guimarães et al. (1971) relataram pela primeira vez toxoplasmose clínica em um macaco *Rhesus* (*Macacca mulata*, espécie do Velho Mundo) e um macaco prego (*Cebus apella*, espécie do Novo Mundo) no Brasil. O *M. mulatta* era de cativeiro do laboratório do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro. O *C. apella* era uma animal de estimação que vivia no subúrbio do Rio de Janeiro. Ambos os animais morreram após um período curto de doença e taquizoítos foram encontrados em seus tecidos. É interesse notar que o macaco prego era rotineiramente alimentado com carne crua. Pouco se sabe da toxoplasmose clínica em primatas selvagens do Novo Mundo. Na natureza, estes animais são herbívoros e vivem em árvores e, portanto, é pouco provável de serem expostos ao *T. gondii* (Dubey et al., 2012). A detecção de anticorpos anti - *T. gondii* em algumas espécies de macaco prego e bugios na natureza indica que alguns destes primatas do Novo Mundo sobrevivem à exposição ao *T. gondii*. No entanto, várias outras espécies de

primatas do Novo Mundo são altamente suscetíveis à infecção experimental e há muitos relatos mundiais de toxoplasmose clínica em animais de cativeiro (Dubey e Beattie, 1988; Dubey, 2010a). No Brasil, toxoplasmose foi diagnosticada em 3 macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*), 7 micos leões de cara dourada (*Leontopithecus chrysomelas*), 3 sagüis imperadores (*Saguinus imperator*), 1 sagui de mão dourada (*Saguinus midus*), 1 Sauim (*Saguinus niger*), 5 macacos barrigudos (*Lagothrix lagotricha*), 1 mico estrela (*Callithrix penicillata*), 1 macaco da noite (*Aotus triviragatus*), 1 mico leão preto (*Leontopithecus chrysopygus*), 2 micos leões dourados (*Leontopithecus rosalia*), 6 bugios (*Alouatta fusca*), e 2 sagüis de tufo branco (*Callithrix jacchus*) que foram examinados *post-mortem* durante 1991 a 2001 (Epiphany et al., 1999, 2000, 2001, 2003), sendo que metade desses animais morreram sem quaisquer sinais clínicos. Pneumonite e hepatite foram as principais lesões (Epiphany et al., 2003). Toxoplasmose fatal também foi observada em 3 macacos de cheiro de uma colônia em cativeiro no Rio de Janeiro (Andrade et al., 2007), e um macaco da noite (*Aotus nigriceps*) de um zoológico em Mato Grosso (Antoniassi et al., 2011).

Toxoplasmose disseminada foi relatada em 3 macacos barrigudos (*Lagothrix lagotricha*) adultos de cativeiro (Tury et al., 1999) e 1 de vida livre (Maluenda et al., 2009).

1.9.5 Aves

Toxoplasmose fatal tem sido relatada em pombos (*Columba livia*), inclusive como epizootia (Carini, 1911; Reis e Nóbrega, 1936; Nóbrega e Reis, 1942; Springer, 1942; Dubey, 2002). Estes estudos relatam a presença de sinais como anorexia, conjuntivite e perda de peso nos animais afetados. *T. gondii* foi encontrado em muitos tecidos, especialmente nos pulmões e no baço dos animais que vieram a óbito (Carini, 1911; Reis e Nóbrega, 1936).

1.9.6 Roedores

A baixa prevalência de *T. gondii* em camundongos e ratos silvestres no Brasil é surpreendente, já que se supõe que o ambiente é altamente contaminado com oocistos (Dubey et al., 2012). *T. gondii* foi isolado em apenas 1 de 20 *Rattus*

norvegicus, mas em nenhum dos 193 *Rattus rattus* e 4 *Mus musculus* de São Paulo (Muradian et al., 2012). Os tecidos de todos estes roedores foram bioensaiados em camundongos e também testados por PCR para pesquisa de DNA de *T. gondii*. DNA do agente foi detectado em tecidos de 1 *M.musculus*, 7 *R.rattus*, e 2 *R. norvegicus*. Araújo et al. (2010) também relataram resultados semelhantes em roedores do Estado do Paraná. Neste estudo, *T. gondii* foi isolado a partir de 1 de 19 *M.musculus* e 1 de 24 *R. rattus*, mas todos estes animais foram seronegativos para *T. gondii*.

1.9.7 Mamíferos marinhos

Em mamíferos marinhos Bandoli e de Oliveira (1977) relataram *T. gondii* taquizoítos e cistos teciduais em cortes histológicos de linfonodos de um boto-cinza (*Sotalia guianensis*) que foi encontrado morto na praia no Rio de Janeiro.

1.10 Aspectos epidemiológicos

A prevalência da infecção em humanos é alta, com estimativas de infecção crônica em indivíduos adultos variando de 10% a 90%, dependendo da região geográfica e hábito alimentar (Tenter et al., 2000; Remington et al., 2011). Aproximadamente um terço da população adulta dos Estados Unidos e mais de 85% dos franceses apresentam sorologia positiva. A prevalência também é significativamente alta na América Latina, variando de 51% a 72% na Argentina, Brasil, Cuba, Jamaica e Venezuela. No continente africano, varia de 54% a 77%. No sul da Ásia, China e Coreia a soroprevalência observada em mulheres e crianças é relativamente baixa, onde os casos positivos variam entre 4% e 39%. Na Escandinávia, região de clima frio, varia de 11% a 28% (Tenter et al., 2000). Na França, 84% das mulheres grávidas possuem anticorpos para *T. gondii*. As cidades de Nova York e Londres apresentaram respectivamente 32% e 22% de soropositividade para Toxoplasmose (Dubey e Beattie, 1988).

1.11 Formas clínicas da toxoplasmose

1.11.1 Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes

A Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática em 80% dos casos de indivíduos que adquiriram a doença. No restante dos casos, os pacientes podem apresentar sintomas parecidos com gripe ou febre, linfadenopatia cervical, podendo estar associada com mialgia, astenia e outros sintomas não específicos (Florence e Darde, 2012).

1.11.2 Toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos

A Toxoplasmose representa uma ameaça aos indivíduos que possuem deficiência no sistema imunológico, onde vários fatores podem prejudicar a imunidade, entre eles a infecção pelo HIV e terapias imunossupressoras (Montoya e Liesenfeld, 2004; Florence e Darde, 2012).

Hospedeiros imunocomprometidos com defeitos das células T, tais como doenças com malignidades hematológicas (especialmente doença de Hodgkin e outros linfomas), receptores de órgãos transplantados, indivíduos com AIDS e pacientes que recebem terapia imunossupressora com corticosteróides e drogas citotóxicas pode desenvolver encefalite, pneumonite e miocardite como manifestações de toxoplasmose. Estas infecções são geralmente fatal se não for detectada e tratada.

A neurotoxoplasmose é a manifestação mais predominante da doença em indivíduos imunodeprimidos, podendo levar a vários sintomas como dores de cabeça, letargia, falta de coordenação, perda de memória e demência. Após o acometimento do cérebro, os órgãos mais afetados são pulmões, olhos e coração no qual pode desenvolver miocardite. Casos de isolamento em outros órgãos como fígado, pâncreas, medula óssea, bexiga, nódulos linfáticos e pele também foram relatados (Florence e Darde, 2012).

A toxoplasmose também tem sido relatada após transplante renal, transplante de fígado e transplante alogênico de medula óssea, onde a febre, encefalite e pneumonia foram as principais características clínicas ocorrendo entre os 3 primeiros meses pós-transplante. Nos transplantes de medula óssea, a doença

freqüentemente atinge o pulmão e está associada com uma taxa de mortalidade maior que 90% (Weiss LM, Dubey JP, 2009).

1.11.3 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita ocorre quando a mãe adquire a infecção durante a gestação. Mães infectadas antes da concepção raramente transmitem o parasita para o feto, exceto nos casos de re-infecção devido supressão imunológica (Alyson et al, 2001).

Estimou-se que ao longo das últimas três décadas, a incidência de infecções pré-natais com *T. gondii* variam de 1 a 100 fetos infectados a cada 10.000 nascimentos em diferentes países. O risco de infecção intra-uterina do feto, depende da gravidade da doença, estado de infecção da mãe durante a gravidez, competência imunológica da gestante durante a parasitemia, número e virulência dos parasitas transmitidos para o feto, e ainda da idade do feto no momento da transmissão. Os efeitos sobre o feto são mais grave se a transmissão ocorrer numa fase precoce da gravidez. No entanto, se a transmissão ocorre numa fase final da gestação os efeitos sobre o feto são menos severos (Tenter et al, 2000; J.P. Dubey e Jones, 2008; Alyson et al, 2001).

Muitas crianças infectadas não apresentam sinais da doença, porém em sua vida adulta pode ocorrer o desenvolvimento de sintomas e deficiências. Essas deficiências podem afetar os olhos (estrabismo, retinocoroidite, cegueira), SNC (deficiências neurológicas e psicomotores, convulsões, retardo mental) e o ouvido (surdez). Estima-se que cerca de um terço das crianças infectadas desenvolverá deficiência visual na vida adulta (Alyson et al, 2001).

Após a infecção congênita o feto ou o bebê podem desenvolver diversas manifestações como hidrocefalia ou microcefalia, calcificações cerebrais e retinocoroidite ou até mesmo aborto. Cerca de 10% das infecções pré-natais resultam em aborto ou morte neonatal. 10 a 23% dos recém-nascidos infectados apresentam sinais clínicos da Toxoplasmose no nascimento. 10% dos fetos infectados mostram uma variedade de sintomas, variando entre complicações nervosas centrais e sintomas não específicos da infecção aguda como retinocoroidite, convulsões, esplenomegalia, hepatomegalia, febre, anemia, icterícia, linfadenopatia, entre outros. Cerca de 12 a 16% dos recém-nascidos não resistem a

doença. Os bebês que sobrevivem sofrem de retardo mental progressivo ou deficiências neurológicas, que muitas vezes necessitam de educação especial (Tenter et al, 2000).

1.11.4 Toxoplasmose ocular

A Toxoplasmose ocular atinge a retina dos olhos causando a Retinite ou Reticoroidite que representa a manifestação mais comum da doença. A Retinocoroidite é uma lesão macular pigmentada com necrose central, podendo ser observada no exame de fundo de olho. Durante o exame será visualizado uma área branca-cinza na retina, necrose com ou sem exsudato, inchaço do disco óptico, vasculite e hemorragia. Retinocoroidite pode ser devida a doença congênita ou adquirida pós-natal podendo estar associada com a infecção aguda ou reativação da doença. Em casos de Retinite que ocorrem durante a infecção aguda pode aparecer sintomas como dor, fotofobia, lacrimejamento e até mesmo a perda da visão. As lesões tendem a ocorrer com a perda progressiva da visão, especialmente quando as lesões são próximas as estruturas centrais dos olhos.(Bonfioli & Orefice, 2005; Dubey e Jones; 2008).

As lesões oculares podem ocorrer na adolescência e na idade adulta, mesmo após o tratamento na infância. Acompanhamento desses pacientes é de extrema importância para evitar mais danos aos olhos (Bonfioli & Orefice, 2005).

1.12 Diagnóstico

1.12.1 Métodos sorológicos

Os sinais clínicos da Toxoplasmose não são específicos para o diagnóstico definitivo da doença, desta forma, o diagnóstico baseia-se principalmente em testes sorológicos que são utilizados para detecção de diferentes classes de anticorpos, como IgA, IgE, IgM, IgG, em fluídos corporais, especialmente em soro. Os anticorpos IgM são detectáveis cerca de 1 semana após o início da infecção e persistem por vários meses, embora possam permanecer detectáveis por anos, após a infecção aguda (Gras et al, 2004). Assim, a presença de IgM no soro humano não é suficiente para estabelecer a infecção pelo *T. gondii*. Anticorpos IgA são

marcadores da infecção aguda, devido sua cinética ser mais rápida quando comparada com da IgM, podendo persistir por muitos meses (Villena et al, 1999; Weiss et al, 2007).

Os testes sorológicos, baseados na avidéz de IgG, determinam em qual momento a infecção foi adquirida, essa informação é fundamental para dar início ao tratamento de gestantes (Saadatnia e Golkar, 2012).

1.12.1.1 Sabin - test dye Feldman

Descrito em 1948, foi o primeiro teste laboratorial capaz de detectar todas as classes de anticorpos contra *T. gondii*, até nos dias de hoje é considerado teste ouro para sorologia da Toxoplasmose (Chetterton et al, 2002).

Esse teste é altamente sensível, específico e quantitativo (Chetterton et al, 2002).

1.12.1.2 Teste de aglutinação direta

Esta técnica não exige equipamentos ou conjugados especiais, uma vez que os anticorpos IgG anti-*T. gondii* reagem com o antígeno da membrana do parasita (Peloux et al, 1973). A sensibilidade e especificidade tem sido classificada em 96% e 98%, respectivamente, sendo considerado um teste de triagem útil em pacientes, e também, na população animal, já que dispensam conjugados espécie-específicos (Johnson et al, 1989).

1.12.1.3 Teste de aglutinação em látex e teste de aglutinação indireta

Este ensaio envolve partículas de látex revestidos com o antígeno inativado do parasita e a aglutinação ocorre na presença de anticorpos de *T. gondii* presentes no soro de humanos ou animais infectados. O teste de aglutinação em látex é sensível e de fácil execução, porém não apresenta alta especificidade (Saadatnia e Golkar, 2012).

1.12.1.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

É um teste amplamente empregado na rotina laboratorial, já que permite a automação, sendo capaz de detectar quantidades pequenas de anticorpos específicos do *T. gondii* no soro. Contudo, pode ser observado resultados falso-positivo devido IgM persistente, fator reumatóide e anticorpos antinucleares (Saadatnia e Golkar, 2012).

Existem algumas variações do teste como o ELISA duplo sanduíche, ou teste de captura de IgM, descrita por Desmonts et al (1981), que permite a detecção direta de IgM específica. Através desse teste foi possível detectar a presença de IgM específica para *T. gondii* em até 92% de pacientes que apresentavam reatividade para Toxoplasmose recentemente adquirida, e eram negativos na reação de Imunofluorescência para IgM (Costa, T. L. et al, 2007).

1.12.1.4.1 Sorotipagem

A infecção causada pelo *T. gondii* ocasiona diversos casos clínicos nos seres humanos, variando de infecções assintomáticas até sintomas de linfadenopatias, retinocoroidite e encefalite. Devido a essas gravidades causadas pela doença, o agente possui grande importância clínica e epidemiológica. Para explorar a correlação entre o tipo de cepa e gravidade da doença é necessário determinar as cepas responsáveis pela infecção. Os ensaios sorológicos (ELISA) utilizando peptídeos sintéticos representam uma importante forma de caracterização das cepas. O ensaio sorológico é um método promissor para sorotipagem por duas razões. Em primeiro lugar, o método detecta os anticorpos que foram formados em decorrência da infecção, e estes por sua vez, permanecem durante a vida do indivíduo independentemente da manifestação clínica e até mesmo em casos assintomáticos. Em segundo lugar, a resposta humoral causada pelo *T. gondii* é específica para o genótipo da cepa infectante (Kong et al, 2003).

1.12.1.5 Ensaio Imunoenzimático (EIA)

Esse ensaio conta com analisadores automáticos que usam uma variedade de métodos de detecção, incluindo a quimioluminescência. A quimioluminescência é

utilizada para a determinação quantitativa de anticorpos específicos anti-*T. gondii* (Sickinger et al, 2008). Esse ensaio possui baixo custo e rápida execução, porém, possui variações de acordo com a natureza do antígeno. Por essas razões, tem sido proposta por vários laboratórios a substituição de antígenos provenientes do extrato proteico total de taquizoítas por antígenos recombinantes, melhorando assim a especificidade do teste (Curdt et al, 2009; Pfrepper et al, 2005).

1.12.1.6 Teste de avidéz de IgG

O teste de avidéz de IgG é utilizado para indicar se infecção foi recentemente adquirida ou se ocorreu no passado. Seu uso diminuiu a necessidade de realizar outros testes sorológicos. Esse teste é baseado na determinação da afinidade funcional (avidéz) de anticorpos IgG específicos para *T. gondii* e são mais úteis em gestantes que apresentam títulos positivos para IgG e IgM no pré-natal, geralmente durante o primeiro trimestre de gravidez. Um resultado com alta avidéz indica que a infecção ocorreu durante os últimos 3 - 5 meses, descartando o risco de infecção fetal (Elyasi et al, 2010; Golkar et al, 2007).

1.12.1.7 Aglutinação por Imunoabsorção (ISAGA)

Técnica utilizada para identificação de anticorpos IgM, importante no diagnóstico de infecções agudas. Os testes são realizados em placas, onde são adicionados antígenos formados por suspensões de toxoplasmas. A aglutinação do soro, só ocorre na presença de IgM específica (Costa, T. L. et al, 2007).

1.12.1.8 Western Blotting (WB)

É um ensaio imunoenzimático utilizado principalmente para o diagnóstico de infecção congênita em recém-nascidos através da detecção de IgA e IgM, representando um importante teste de confirmação para infecção de Toxoplasmose. Os anticorpos IgM ou IgA podem não ser detectáveis em alguns recém-nascidos que apresentam infecção congênita. Nestes casos, as amostras de soro materno e do recém-nascido são ensaiadas no WB, concomitantemente, para comparar o perfil de anticorpos, indicando se houve transferência passiva de anticorpos IgG maternos e

infecção ativa do feto. É um teste altamente sensível e específico, sendo comercializado na forma de kit para detecção de IgM e IgG (Saadatnia e Golkar, 2012).

1.13 Profilaxia

A prevenção consiste em medidas de higiene como lavagem das mãos, frutas e vegetais. Caixas de areia usados por gatos devem ser trocadas a cada dois dias, de preferência utilizando luvas e máscaras. Carne mal cozida representa uma das principais fontes de infecção em seres humanos, inclusive em gestantes. Consumo de água não filtrada e não tratada também são responsáveis pela transmissão da doença, devendo ser evitada (Florence e Darde, 2012).

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando peptídeos sintéticos polimórficos específicos para cada genótipo de *T. gondii*.

2.2 Específico

Determinação da prevalência das linhagens de *T. gondii* em animais de produção a partir de amostras de soro estocadas no banco de material biológico do laboratório de Protozoologia do IMTSP/USP.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Parasitas

3.1.1 Cepa RH (tipo I)

É mantida rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por meio de passagens sucessivas em camundongos *Swiss* (não isogênicos) ou C57Bl/6j (isogênicos), através de lavagem peritoneal com solução salina ou salina tamponada com fosfato (PBS) – NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 e subsequente inóculo intraperitoneal (i.p.) em novos animais.

3.1.2 Cepa ME49 (tipo II)

Esta cepa foi fornecida pelo Prof. Dr. Fausto Araújo, (UCLA) e é mantida rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo através de sucessivas passagens com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos *Swiss* (não isogênicos) ou C57Bl/6j (isogênicos). Cada animal foi inoculado via oral, com uma suspensão de 10 cistos/animal, obtida após maceração de cérebro de camundongos previamente infectados, com 3mL de PBS 0,01M pH7,2 estéril com antibióticos (Penicilina Cristalina 25.000 UI/mL e Estreptomicina 10mg/mL). Para quantificação dos cistos, cerca de 25 µL da suspensão cerebral será colocada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio de luz.

3.1.3 Cepa VEG (tipo III)

Esta cepa foi fornecida pelo Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro (UEL) e é mantida cronicamente em camundongos *Swiss* (não isogênicos) ou C57Bl/6j (isogênicos), da mesma forma que a cepa ME-49.

3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.2.1 Detecção de anticorpos IgG específicos utilizando extrato proteico de *T.gondii*

3.2.1.1 Preparação e quantificação do antígeno solúvel de *T.gondii*

O extrato antigênico de taquizoítos foi obtido através do aprimoramento da metodologia descrita por Camargo et al (1978). Para obtenção de antígeno proteico solúvel de *T. gondii* foram utilizados 3×10^8 taquizoítos da cepa RH. A suspensão parasitária obtida através do lavado peritoneal de animais infectados, foi purificada por filtração em membrana de policarbonato 5 μm (Millipore®) e centrifugada a 700g por 10 minutos a 4°C. O precipitado suspenso em 5 ml de água destilada foi submetido a sonicação (0.40 MHz, 4 Vdc) por 4 períodos de 30 segundos, em banho de gelo via sonicador de ponta Thornton®. Após certificação microscópica da lise total dos taquizoítos, foi acrescentado 5 ml de solução de NaCl 0,3M e a suspensão foi centrifugada a 10.000g a 4°C por 30 minutos, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403. A concentração proteica de antígeno solúvel foi determinada no sobrenadante pelo método de Bradford utilizando γ -globulina humana como padrão (Bradford, 1976), sendo separado em alíquotas e mantidos à - 70°C até o momento de seu uso. Todas as reações foram realizadas com uma mesma partida de antígeno.

3.2.1.2 Descrição da técnica

A técnica foi descrita por Venkatesan e Walkelin (1993). As placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação (Costar®) foram sensibilizadas com 100 μl /poço de proteínas de *T. gondii* (extrato antigênico solúvel), suspensas no tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9.5, numa concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno. Após sensibilização por 20 horas à 4°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,01M pH 7.2 contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 0,3% de solução de leite desnatado (Molico®) em PBST durante 1 hora na estufa a 37°C.

Após bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes e as amostras de soro (100 µL/poço), diluídas 1:100 em PBST contendo 3 % de leite desnatado, foram depositadas nas placas e incubadas a 37°C por 1 hora. Após três novas lavagens foram colocados 100 µl por cavidade de conjugado imunoenzimático marcado com peroxidase e a placa foi novamente, incubada por 1 hora a 37°C.

Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5.8 contendo OPD 0,4mg/ml e H₂O₂ 0,03% e interrompida, após 30 minutos, pela adição de HCl 4N. A leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada no leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm.

O *cut off* da reação foi determinado a partir dos resultados da densidade óptica de 40 amostras de soros negativos seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{Cut off} = \text{Média das DOs} + 3^* \text{ desvio padrão da média das DOs}$$

3.2.2 Detecção de anticorpos IgG específicos utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos

3.2.2.1 Peptídeos sintéticos cepa-específicos

Utilizamos quatro peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos das proteínas dos grânulos densos GRA6 ou GRA7 de *T. gondii* e uma sequência anteriormente descrita por Kong et al (2003) e Sousa et al (2008; 2009). O peptídeo denominado GRA6II (LHPGSVNEFDF) apresenta polimorfismo específicos para cepas do tipo II. O peptídeo GRA6I/III (LHPERVNVFDY) é derivado de um epítomo de GRA 6 de cepas do tipo I e III, a sequência (LEQEVPESGEDGEDARQ), nomeada GRA7I, é derivada de um epítomo GRA7 de cepas do tipo I e o peptídeo GRA7III (PEHEVPESGEDREDARQ) apresenta polimorfismo específico para cepas do tipo III. Além destes peptídeos, foi utilizada a sequência (EVDYRLFNP) caracterizada como controle. Todos os peptídeos foram sintetizados pela Invitrogen®, apresentando grau de pureza de 70%.

3.2.2.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent (ELISA) com peptídeos sintéticos cepa-específicos

A padronização inicial do ensaio imunoenzimático utilizando peptídeos sintéticos cepas específicos foi realizada com amostras de soros de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com cepas geneticamente distintas de *T. gondii*. Para a avaliação da resposta imune humoral cepa específica foi realizado ensaio imunoenzimático (ELISA) com peptídeos sintéticos cepa específicos de acordo com a metodologia realizada por Sousa et al (2010), com pequenas modificações. Brevemente, as placas possuem 96 poços revestidas com ligantes de aminas primárias (Immobilizer amino plates, Nunc®) foram sensibilizadas com 10µg/mL de cada peptídeo (100µL/poço) suspensos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9.6 por 20 horas a 4°C em câmara úmida. A seguir, foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,02M pH 7.2 contendo 0,3% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 3% de BSA em PBST durante 1 hora na estufa a 37°C. Após bloqueio e três lavagens com PBST, as amostras de soro na diluição 1:50 (100µL/poço) foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após três novas lavagens, foi adicionado 100 µL de conjugado espécie-específico marcado com peroxidase (Sigma®) na diluição de 1:5000 e as placas foram mantidas na estufa por 1 hora a 37°C. Após a lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5.8 contendo OPD 0,4mg/mL e H₂O₂ 0,03%, por 30 minutos em câmara escura, seguida de estabilização pela adição de HCl 4N. A absorbância dos poços foi determinada em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm.

As amostras de soro de bovinos, caprinos e ovinos foram ensaiadas de acordo com o protocolo descrito acima, sendo que para cada espécie, a padronização do ELISA foi realizada a partir de amostras obtidas de animais experimentalmente infectados com as cepas ME49 (tipoll) e VEG (tipo III).

3.3 Análise Estatística

A comparação de dados numéricos foi feita por ANOVA, após verificação da homogeneidade de variâncias. Na ausência, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Amostras foram consideradas com diferença significativa quando a

probabilidade de igualdade entre elas foi menor que 5% em todos os testes estudados ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Detecção de anticorpos IgG específicos utilizando extrato proteico de *T.gondii*

Foram testadas 200 amostras de soros bovinos, 173 amostras de soros caprinos e 169 amostras de soros ovinos, obtidos da soroteca do Laboratório de Protozoologia do IMT/USP.

O *cut off* das reações foi determinado a partir dos resultados das densidades ópticas (DOs) de 40 amostras de soros negativos de cada espécie estudada, como já descrito nos materiais e métodos, sendo que para as amostras bovinas foi utilizado um valor de corte de 0,459, para amostras caprinas 0,336 e para amostras ovinas 0,497.

Entre 200 amostras de soros bovinos analisadas, 115 foram reagentes no ELISA, com uma prevalência de 57.50% (Figura 2), já na espécie caprina foram analisadas 173 amostras, 100 foram reagentes, com uma prevalência de 42,78% (Figura 3), para a espécie ovina 169 amostras foram analisadas, 101 foram reagentes, prevalência de 59,76% (Figura 4).

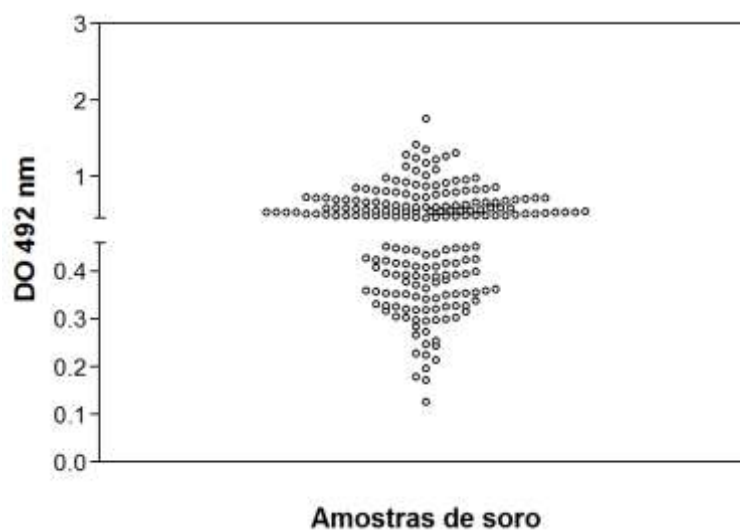


Figura 2 - Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro bovino, utilizando extrato proteico de *T.gondii*.

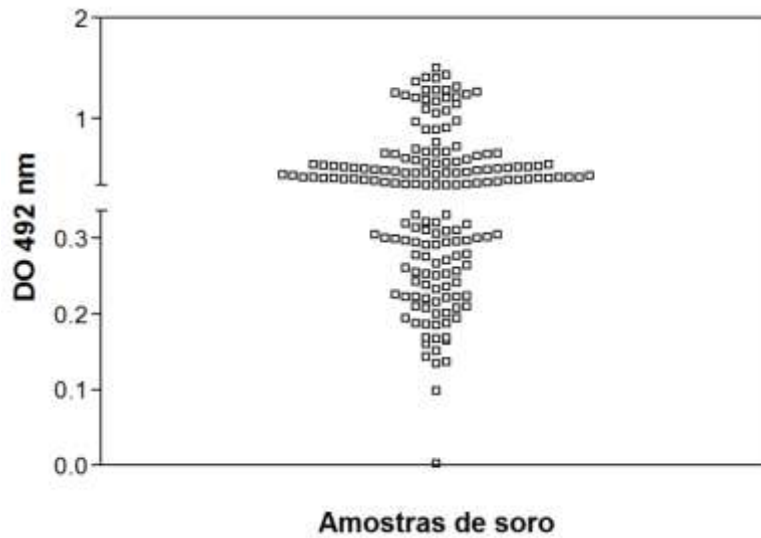


Figura 3 - Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro caprino, utilizando extrato proteico de *T.gondii*.

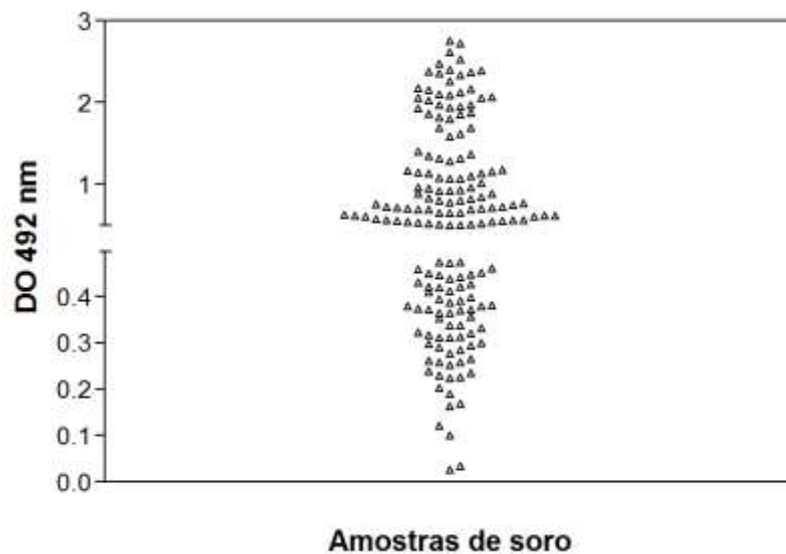


Figura 4 - Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro ovino, utilizando extrato proteico de *T.gondii*.

4.2 Padronização da reação de ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos

Na padronização do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos foram utilizadas amostras de soro de camundongos previamente infectados com diferentes linhagens de *T. gondii*

como já descrito em materiais e métodos. Na figura 5 podemos observar que os soros dos animais infectados com a cepa RH (tipo I) e VEG (tipo II) foram mais reativos ao peptídeo GRA6I/III quando comparados com a cepa ME (tipo II). Os soros de animais infectados com a cepa ME (tipo II) apresentaram maior reatividade ao peptídeo GRA6II, sendo específicos para cepas tipo II. Os animais infectados com a cepa RH (tipo I) foram mais reativos ao peptídeo GRA7I, específicos para cepas tipo I e os animais infectados com a cepa VEG (tipo III) foram mais reativos ao peptídeo GRA7III, específico para cepas tipo III, mostrando que o ELISA com peptídeos sintéticos cepa-específico é uma abordagem promissora para estudos da sorotipagem.

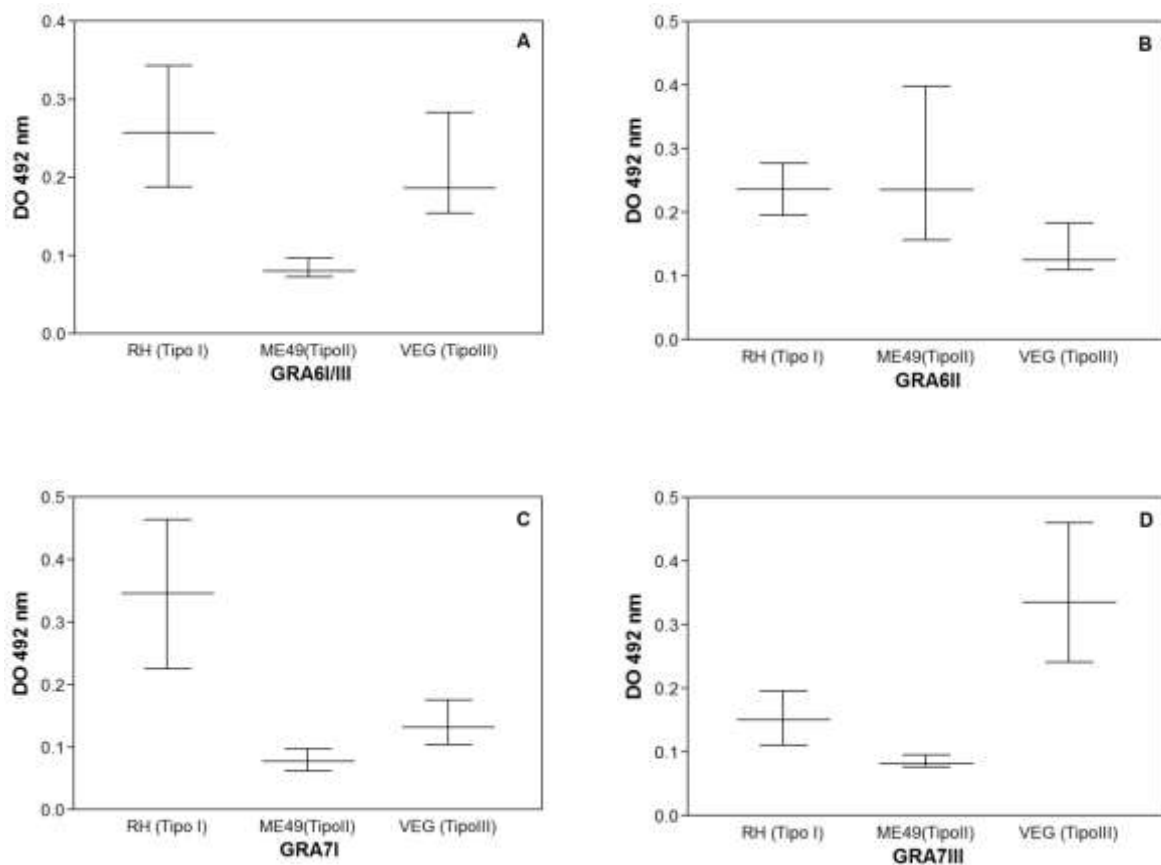


Figura 5 – Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de camundongos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.

Durante a padronização dos ensaios de ELISA com peptídeos sintéticos avaliamos a reprodutibilidade intratestes, já que as amostras foram testadas em duplicata, e também, a reprodutibilidade intertestes a partir do ensaio das amostras em dias diferentes. Como podemos verificar na Figura 6, as reprodutibilidades intratestes e intertestes dos peptídeos sintéticos foram altas para ambas as cepas testadas (ME49 e VEG), mostrando que o teste imunoenzimático proposto é reprodutível, possibilitando sua utilização em ensaios de rotina diagnóstica.

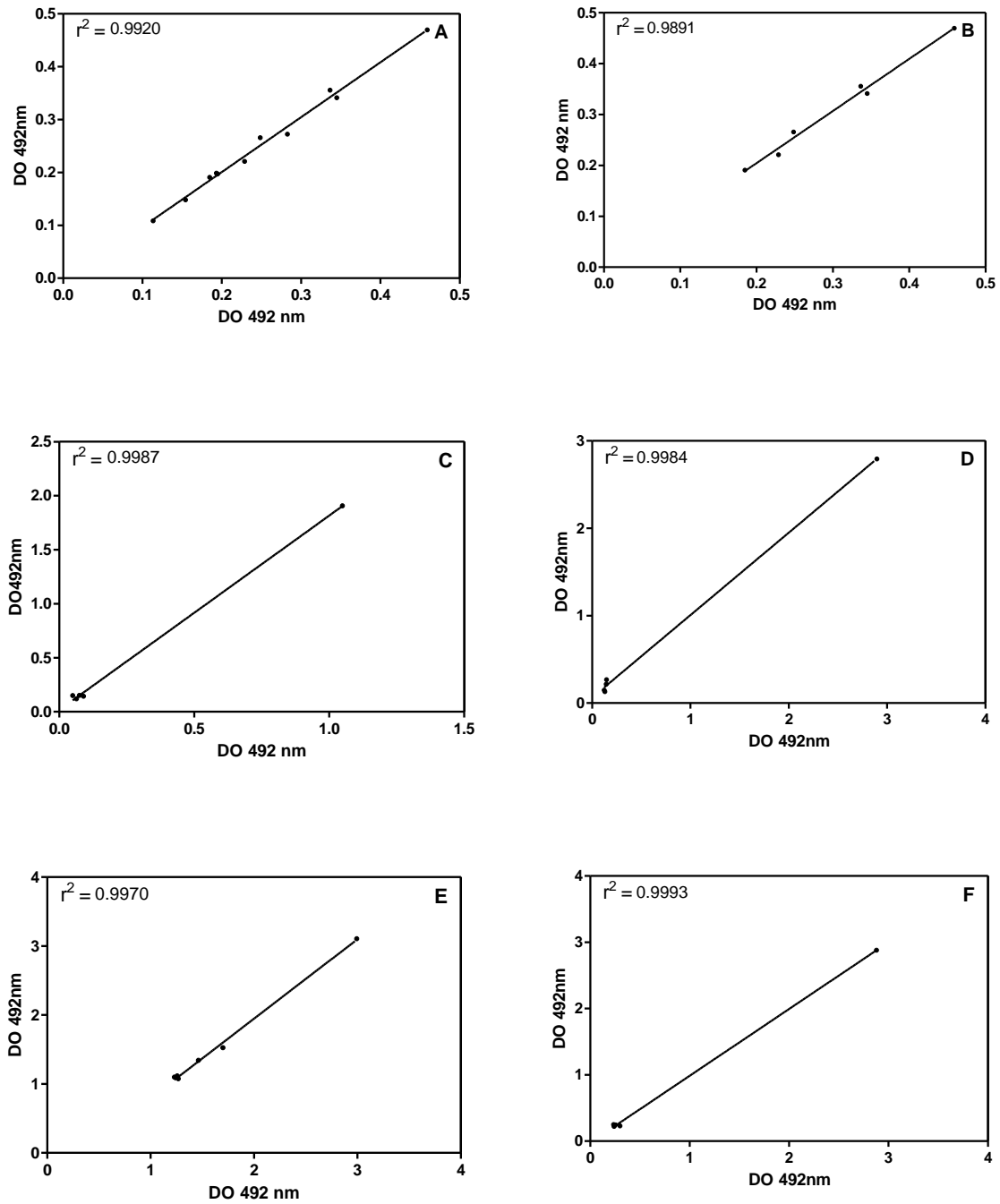


Figura 6: Resultados dos ensaios de reprodutibilidade intra e interteste para amostras de soros de camundongos infectados com cepas geneticamente distintas de *T.gondii*, utilizando peptídeos sintéticos cepa específicos. A: Reprodutibilidade intratest para cepa RH. B: Reprodutibilidade interteste para cepa RH. C: Reprodutibilidade intratest para cepa ME49. D: Reprodutibilidade interteste para cepa ME49. E: Reprodutibilidade intratest para cepa VEG. F: Reprodutibilidade interteste para cepa VEG.

Uma vez padronizada a reação de ELISA para detecção de anticorpos IgG contra peptídeos sintéticos cepa-específicos, utilizando soros de camundongos experimentalmente infectados com cepas geneticamente distintas de *T.gondii*, esta reação foi aplicada em amostras de soros de bovinos, ovinos e caprinos, previamente triadas contra extrato antigênico proteico de *T.gondii*. Assim, foram selecionadas randomicamente 100 amostras de soro de cada espécie para sorotipagem pelo ELISA utilizando peptídeos sintéticos.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos para as amostras de soro bovino, onde podemos observar uma reatividade semelhante dos soros para os diferentes peptídeos, sem discriminação do genótipo da cepa infectante.

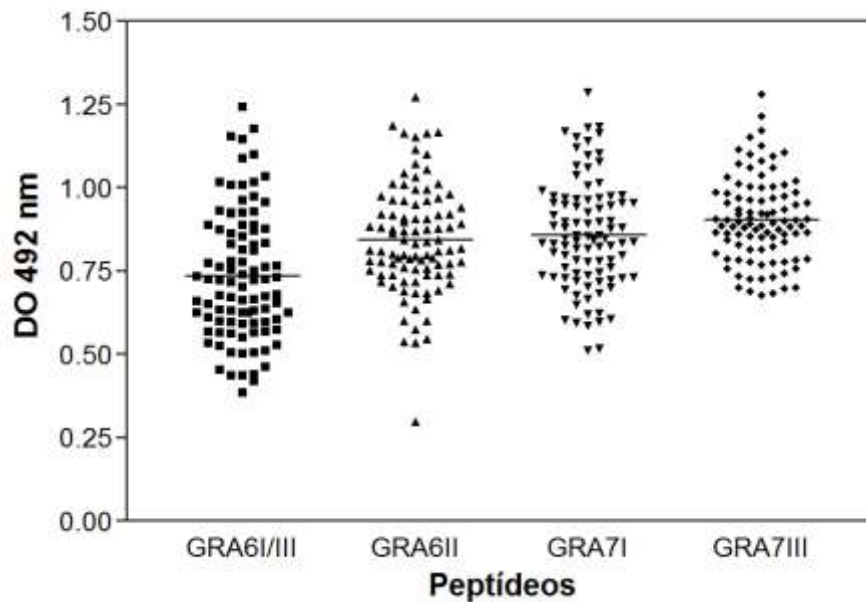


Figura 7 - Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de bovinos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.

A Figura 8 mostra os resultados obtidos das amostras de soro de caprinos, onde podemos observar uma maior reatividade das amostras contra o peptídeo GRA7III, sugerindo uma maior prevalência de infecção dos animais por cepas do tipo III ($p < 0,01$).

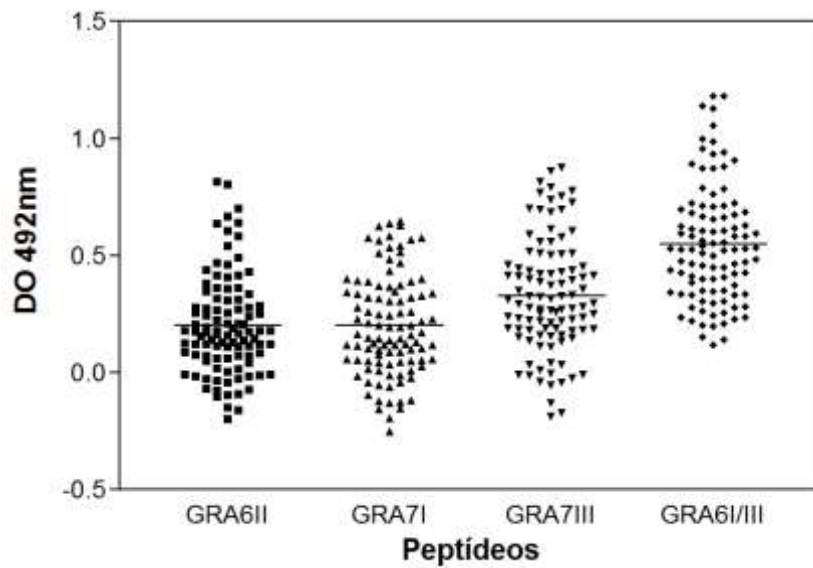


Figura 8 - Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de caprinos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.

Na figura 9 podemos observar que as amostras de soros de ovinos apresentaram o padrão de reatividade aos peptídeos sintéticos similar a dos caprinos, com maior reatividade das amostras para o peptídeo GRA6I/III ($p < 0,001$), porém para esta espécie, a reatividade contra o peptídeo GRA7III foi semelhante aos peptídeos GRA6II e GRA7I.

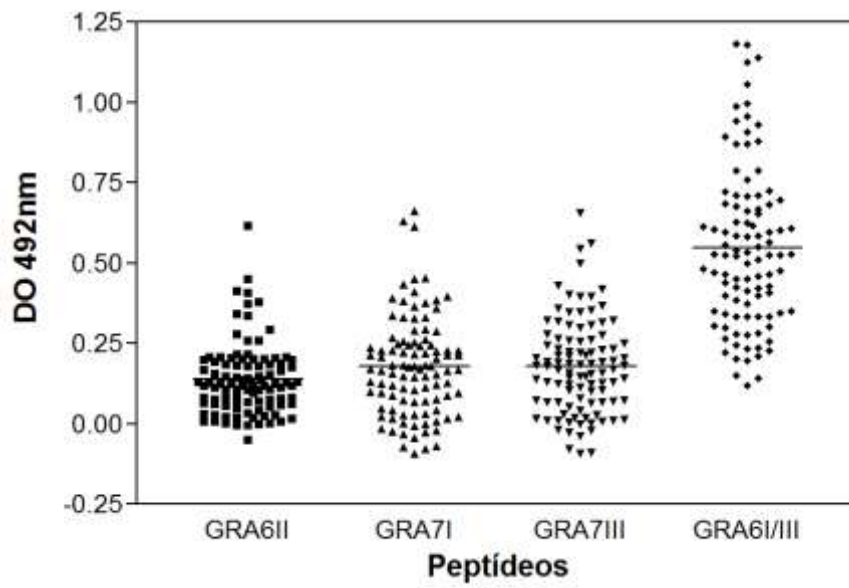


Figura 9 - Resultados do ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de ovinos, utilizando peptídeos sintéticos cepa-específicos.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se peptídeos quimicamente sintetizados, correspondentes a epítomos imunogênicos de duas proteínas dos grânulos densos de *T. gondii*, GRA6 e GRA7. As proteínas dos grânulos densos, além de estarem envolvidas com a aquisição de nutrientes pelo parasita (Carruthers, 2006), são secretadas após a invasão da célula hospedeira no interior do vacúolo parasitóforo, tornando o ambiente favorável à multiplicação dos taquizoítos (Carruthers, 1999). As proteínas dos grânulos densos são fortemente reconhecidas por anticorpos de indivíduos infectados com *T. gondii*, permitindo sua utilização como antígenos em ensaios imunoenzimáticos (Kong *et al.*, 2003).

Estudos de sorotipagem de *T.gondii* por ensaios imunoenzimáticos com peptídeos sintéticos cepa- específicos têm demonstrado resultados promissores tanto para amostras humanas (Kong *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2008,2009) como animais (Sousa *et al.*, 2010), sendo uma abordagem factível para estudos epidemiológicos, permitindo a determinação de cepas prevalentes em uma região geográfica.

Grande parte das informações disponíveis sobre a estrutura populacional de *T. gondii* provêm de isolados originários da Europa e da América do Norte e, tanto no caso de humanos, como de animais domésticos, a maioria destes isolados pertence a cepas do tipo II, ao passo que os isolados de várias regiões da América do Sul, incluindo o Brasil, apresentam genótipos distintos, sugerindo a existência de linhagens recombinantes, altamente virulentas (Dubey *et al.*, 2012). Vários trabalhos têm demonstrado uma relação significativa entre o genótipo do agente e gravidade da doença humana (Carme *et al.*, 2009; Demar *et al.*, 2007).

Uma explicação plausível para o surgimento dos genótipos recombinantes baseia-se no fato de que a infecção no hospedeiro definitivo possa ocorrer a partir de material proveniente de hospedeiros intermediários infectados com múltiplas cepas. No hospedeiro definitivo, a reprodução sexuada gera recombinações capazes de se expandir para novos nichos ecológicos, causando formas graves da doença (Grigg *et al.*, 2001). Pesquisas realizadas no Brasil demonstraram uma grande diversidade

genética em isolados de humanos (Ferreira et al., 2011), e animais como felinos (Su et al., 2006; Pena et al., 2008), cães (Dubey et al., 2007), galinhas (Dubey et al., 2008), capivaras (Yai et al., 2009) e pequenos ruminantes (Ragozo et al., 2010).

Embora as técnicas moleculares freqüentemente apresentem uma boa precisão na determinação do genótipo do parasita, alguns trabalhos apontam determinados problemas a elas relacionados. Um dos principais vieses refere-se à ao isolamento das cepas, o que representa uma tarefa difícil e dispendiosa, além de, no caso de uma caracterização indireta, com o crescimento prévio em meios de cultura, ou em modelos experimentais, levar à seleção de cepas mais virulentas (Fuentes et al., 2001).

Uma alternativa vantajosa a estas técnicas seria a análise direta do genótipo de *T. gondii*, que requer um mínimo crescimento do parasita, considerando a possibilidade do emprego de amostras clínicas primárias passíveis de estocagem, tais como amostras de líquido cérebro-espinhal, sangue, lâminas de cultura e cortes de tecidos parafinados e fixados em formalina, úteis nos casos em que o isolamento de cepas vivas torna-se inviável (Howe et al., 1997).

Outra dificuldade da genotipagem de amostras de *T. gondii* decorre da própria natureza da infecção. No caso das infecções crônicas, em que são observados cistos teciduais latentes, bem como a ausência de parasitas circulantes, nem sempre é possível a obtenção de material para a caracterização das cepas responsáveis por infecções em pacientes assintomáticos, o que representa um problema importante, já que estas infecções correspondem à maioria dos casos de toxoplasmose humana (Khan et al., 2005). É importante ressaltar, ainda, a questão dos laboratórios empregarem diferentes marcadores moleculares, dificultando a comparação de resultados.

Dados os problemas verificados na tipagem de *T. gondii* por meio de técnicas moleculares, a sorologia representa uma alternativa valiosa não apenas em relação ao diagnóstico da toxoplasmose adquirida, como também ao monitoramento de pacientes com infecção crônica, sendo possível, ainda, detectar a reinfecção por *T. gondii* (Dzitko et al., 2006), já que anticorpos contra proteínas do parasita permanecem em altos títulos durante toda a vida do hospedeiro, o que permite o diagnóstico mesmo nos casos assintomáticos (Kong et al., 2003).

Contudo, a sorotipagem com peptídeos sintéticos cepa - específicos pode apresentar algumas desvantagens. Neste estudo, por exemplo, alguns soros reagiram com peptídeos derivados tanto das linhagens clonais dos tipos I/III quanto do tipo II de *T. gondii*. Esse padrão de reação também foi verificado em trabalhos anteriores, ao se analisarem polipeptídeos recombinantes derivados de GRA5 e GRA6, havendo reação cruzada do peptídeo derivado de GRA6 do tipo III com o peptídeo do tipo II (Peyron et al., 2006). Kong et al. (2003) também descreveram reações cruzadas entre peptídeos sintetizados quimicamente derivados de alelos de GRA6 e GRA7.

Em nosso trabalho, verificamos que as amostras de soros bovinos apresentaram um padrão de reatividade semelhante para todos os peptídeos avaliados, impedindo a identificação do genótipo da cepa infectante. Já os resultados das amostras dos caprinos e ovinos demonstraram uma maior reatividade aos peptídeos GRA6I/III e GRA7III, indicando uma maior prevalência de infecção por cepas do tipo III. Nossos dados corroboram com o estudo realizado por Sousa et al. (2010) que relataram a ocorrência de infecção por cepas do tipo III em rebanhos ovinos da Europa.

Interessante notar que, em nosso trabalho, o perfil de reatividade dos soros das diferentes espécies animais não foi uniforme para todos os peptídeos testados, sendo que a maioria das amostras apresentou menor reatividade para o peptídeo GRA7I. Sousa et al. (2009) analisaram a sequência dos genes GRA6 e GRA7 obtidos de 49 cepas não clonais, com o objetivo de definir peptídeos para sorotipagem de infecções por *Toxoplasma*. Dois peptídeos específicos para linhagens clonais I e III, peptídeos dos GRA7I e GRA7III, respectivamente, foram selecionados a partir do locus de GRA7 e amostras de soro de indivíduos infectados com cepas de genótipos conhecidos de *Toxoplasma* foram sorotipadas com estes peptídeos, sendo que o peptídeo GRA7III foi o melhor marcador para a sorotipagem de infecções causadas por cepas do tipo III, enquanto que o peptídeo GRA7I apresentou baixa sensibilidade e especificidades, reagindo com as amostras de soro de pacientes infectados com diferentes linhagens de *T.gondii*. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no nosso trabalho, onde o peptídeo GRA7I apresentou uma menor discriminação das amostras.

Um aspecto importante que deve ser ressaltado em estudos de sorotipagem é o fato de que amostras recombinantes, típicas da América do Sul, apresentam um padrão de polimorfismo que impede sua identificação pelos peptídeos sintéticos usuais. Sousa et al. (2008) padronizaram um ensaio imunoenzimático para sorotipagem de amostras humanas de três diferentes continentes, utilizando peptídeos sintéticos derivados de grânulos densos GRA6, semelhantes aos utilizados em nosso trabalho, e verificaram que a metodologia é promissora, porém apresenta limitações para isolados provenientes da África e da América do Sul, em consequência do polimorfismo das cepas circulantes nestes regiões, sugerindo a necessidade do desenvolvimento de peptídeos provenientes de diferentes marcadores que permitam a discriminação de cepas clonais e cepas não clonais.

Nosso trabalho demonstrou que os ensaios sorológicos com peptídeos sintéticos cepa-específicos são promissores, pois permitem diagnóstico rápido, sem necessidade de isolamento prévio do agente, porém é necessário o desenvolvimento de novos peptídeos para identificação de cepas brasileiras e cepas atípicas recombinantes. Isto permitiria a utilização da sorotipagem para inúmeras finalidades como associação do genótipo do parasita com a gravidade da doença humana, possibilitando tratamento diferenciado para infecções com genótipos mais virulentos. Além disso, esta abordagem também seria de extrema importância em estudos epidemiológicos para determinação dos genótipos das cepas mais prevalentes em uma determinada área geográfica, permitindo a seleção de cepas regionais para imunização dos rebanhos destinados ao consumo humano, reduzindo o risco de transmissão da doença pela carne.

6 CONCLUSÕES

Nossos dados de padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) com peptídeos sintéticos cepa-específicos para *T.gondii*, utilizando amostras de animais experimentalmente infectados com cepas geneticamente distintas do agente, demonstraram que esta abordagem é bastante promissora, já que permitiu a identificação genotípica de cada cepa infectante. Contudo, quando aplicada em amostras de animais de produção, naturalmente infectados, a capacidade de identificação da cepa circulante entre as diferentes populações estudadas foi menor, principalmente para a espécie bovina.

Para pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) o método apresentou melhores resultados, sugerindo que a infecção dos animais tenha ocorrido por cepas do tipo III, já que as amostras tiveram uma maior reatividade para os genótipos GRA6I/III e GRA7III, abrindo perspectivas futuras da aplicação desta metodologia em estudos epidemiológicos voltados para prevalência da cepa circulante em uma determinada região, bem como, sua distribuição nos rebanhos. Isto seria de extrema importância para a seleção de cepas para imunização da população animal destinada ao consumo humano, prevenindo, assim, a transmissão da doença ao homem através do consumo da carne contaminada pelo agente.

Nossos dados mostram que a sorotipagem é uma ferramenta útil, mas precisa de refinamentos, principalmente em relação à seleção dos peptídeos que serão utilizados nos ensaios. Assim, é necessário um maior investimento em estudos genômicos que permitam a identificação de sequências de peptídeos específicos para cepas brasileiras, já que estas não são na sua maioria clonais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALYSON, Kaye, et al. **Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants.** J Pediatr Health Care; 25, 355-364, 2011.
- AMENDOEIRA, Maria RR et al. **Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in isolated Amerindians, Mato Grosso.** Rev Soc Bras Med Trop. 36(6):671-6, Nov-Dec 2003.
- ANDRADE, MCR et al. **Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis.** Cienc Rural. 37:1724–7, 2007.
- ANTONIASSI, NAB et al. **Granulomatous meningoencephalitis due to *Toxoplasma gondii* in a black-headed night monkey (*Aotus nigriceps*).** J Wildl Zoo Med. 42: 118–20, 2011.
- ARAÚJO, JB et al. **Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil.** Vet Parasitol. 174:328–31, 2010.
- ARAÚJO, PR; FERREIRA, AW. **High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis.** Rev Inst Med Trop São Paulo. 52:63-8, 2010.
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M. et al. **Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil.** Emerg. Infect. Dis. 9, 55–62, 2003.
- BANDOLI, JG; DE OLIVEIRA, CAB. **Toxoplasmose em *Sotalia guianensis* (van Beneden, 1863), Cetacea-Delphinidae.** Folha Med. 75:459–68, 1977.
- BELFORT-NETO et al. **High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil.** An Acad Bras Ciênc. 79:111–4, 2007.
- BELTRAME, MA et al. **Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil.** Vet Parasitol. 10;188(3-4):225-30, Sep 2012.
- BENENSON, MW et al. **Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water.** The New England Journal of Medicine, v. 307, p. 666–9, 1982.
- BONAMETTI, AM et al. **Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino.** Rev Soc Bras Med Trop. 30:21–5, 1997a.
- BONAMETTI, AM et al. **Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding.** J Trop Pediatr. 43(2):116, Apr 1997.
- BONFIOLI, AA; OREFICE, F. **Toxoplasmosis. Seminars in Ophthalmology**, 20(3), 129-141, 2005.

- BOWIE, WR et al. **Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water.** The Lancet, v. 350, p. 173-7, 1997.
- BRESCIANI, KD et al. **Antibodies to Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil.** Parasitol Res. 100(2):281-5, Jan 2007.
- BUXTON, D et al. **Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant.** Vet Rec. 129(5):89-93, 1991.
- CAMARGO, EP; ITOW, S; ALFIERI, SC. **Proteolytic activities in cell extracts of trypanosomatids.** J Parasitol. 1978 Dec;64(6):1120-1.
- CARINI, A. **Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*.** Bull Soc Pathol Exot. 4:518–9, 1911.
- CARME, B et al. **Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana.** Emerg Infect Dis;15(4):656-8. doi: 10.3201/eid1504.081306, Apr 2009.
- CARRUTHERS, VB. **Proteolysis and *Toxoplasma* invasion.** Int J Parasitol. 36(5):595-600, 2006.
- CARRUTHERS, VB. **Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells.** Parasitol Int. 48(1):1-10, 1999.
- CAVALCANTE, ACR et al. **Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil.** Small Rumin Res. 69:79–82, 2007.
- CAVALCANTE, ACR et al. **Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil.** Arq Bras Med Vet Zootec., 60:36–41, 2008.
- CHIARI, CA; NEVES, DP. **Human toxoplasmosis acquired by ingestion of goat's milk.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 79(3):337-40, Jul-Sep 1984.
- COELHO et al. **Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil.** Parasitol Res. 109(4):1009-13, Oct 2011.
- COSTA, GHN et al. ***Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts.** Exp Parasitol. 127:277–81, 2011.
- COSTA, TL et al. **Diagnóstico Clínico e Laboratorial da Toxoplasmose.** NewsLab - edição 85, 2007.
- COUTINHO, SG; LOBO R; DUTRA, G. **Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil.** J Parasitol. 68(5):866-8, Oct 1982.

CURDT, I et al. **Development of fully automated determination of marker-specific immunoglobulin G (IgG) avidity based on the avidity competition assay format: application for Abbott Architect cytomegalovirus and Toxo IgG Avidity assays.** J Clin Microbiol; 47:603 – 13, 2009.

DA SILVA, AV et al. **Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil.** Vet Zootec. 15:263–6, 2008.

DA SILVA, AV; DA SILVA, RC; ZAMPROGNA, TO. ***Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira.** Sci Med (Porto Alegre). 20:120–30, 2010.

DA SILVA, AV; LANGONI, H. **The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR).** Vet Parasitol. 97:191–8, 2001.

DA SILVA, AV et al. **Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage.** Parasitol Latinoam.;60:65–8, 2005a.

DA SILVA, RC et al. **Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified.** Vet Parasitol. 175: 173–7, 2011.

DE ALMEIDA, MAB et al. **Surto intra familiar de toxoplasmose, Santa Vitória do Palmar-RS, Julho de 2005.** Bol Eletron Epidemiol. [Internet] 2006 [citado 2012 Set 14];6(3):1–7. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_03_06.pdf.

DE MORAES, EPBX et al. ***Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil.** Vet Parasitol. 183:152–5, 2011.

DE SOUZA JT, WELLER DM, RAAIJMAKERS JM. **Frequency, Diversity, and Activity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent Pseudomonas spp. in Dutch Take-all Decline Soils.** Phytopathology. 93(1):54-63, Jan 2003 .

DEMAR, M et al **Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects.** Clinical Infect Diseases, v. 1/45, n. 7, p. 88-95, Out 2007.

DESMONTS, G, et al. **Étude épidémiologique sur La toxoplasmose: de l'influence de La cuisson des viandes de boucherie sur La fréquence de l'infection humaine.** Rev Fr Études Clin Biol; v. 10; pág. 95- 958, 1965.

DESMONTS, G, NAOT, Y, REMINGTON, JS. **Immunoglobulin M-immunsorbent agglutination assay for diagnosis of infectious disease: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections.** J Clin Microbiol 14: 486, 1981.

DUBEY, JP; BEATTIE, CP. **Toxoplasmosis of animals and man.** Boca Raton: CRC Press;. p. 41-60, 1988.

DUBEY, JP et al. **Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil.** J Parasitol. 93:60–4, 2007a.

DUBEY, JP; JONES, JL. ***Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States.** Int J Parasitol. 38:1257-78, 2008.

DUBEY, JP; KIRKBRIDE, CA. **Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs.** J Am Vet Med Assoc.195:1715-6, 1989.

DUBEY, JP et al. **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.** Parasitology. 139(11):1375-424, Sep 2012.

DUBEY, JP et al. **Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork.** J Am Vet Med Assoc. 188:1035–37, 1986.

DUBEY, JP et al. **Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil.** Vet Parasitol. 157:299–305, 2008.

DUBEY, JP. **A review of toxoplasmosis in wild birds.** Vet Parasitol. 106:121– 53, 2002.

DUBEY, JP. **Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*.** J Eukaryot Microbiol; 44(6):592-602, Nov-Dec 1997.

DUBEY, JP. ***Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, clinical disease, diagnosis, and public health significance.** Zoonoses Public Health. 57:60–73, 2010b.

DUBEY, JP. **Toxoplasmosis in pigs – the last 20 years.** Vet Parasitol 164:89–103, 2009b.

DUBEY, JP. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.. p.305, 2010a.

DUBEY, JP; JONES, JL ***Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States.** International Journal for Parasitology 38, 1257–1278, 2008.

DUBEY, JP et al. **Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar.** Veterinary Parasitology, v. 20/172, n. 3-4, p. 195-203, Set 2010.

DUBEY, JP; PROWELL, M. **Ante-Mortem Diagnosis, Diarrhea, Oocyst Shedding, Treatment, Isolation and Genetic Typing of *Toxoplasma gondii* Associated with Clinical Toxoplasmosis in a Naturally Infected Cat.** Journal Parasitology, Ago 2012.

DUBEY, JP. **The History of *Toxoplasma gondii* —The First 100 Years.** Journal compilation; v. 55(6), pág. 467–475, 2008.

- DUBEY, JP; FRENKEL, JK. **Cyst-induced toxoplasmosis in cats.** Journal of Protozoology, v. 19, p. 155–177, 1972.
- ELYASI,H et al. **Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy.** Clin Vaccine Immunol; 17:1349 – 55, 2010.
- EIPHANIO, S; CATÃO-DIAS, JL; GUIMARÃES, MABV. **Toxoplasmosis in emperor tamarin (*Saguinus imperator*): case report.** Braz J Vet Res Anim Sci. 36:2, 1999.
- EIPHANIO, S et al. **Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity.** J Zoo Wildl Med. 31:231–5, 2000.
- EIPHANIO, S et al. **Toxoplasmosis in a wild-caught black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*).** Vet Rec. 149: 627–8, 2001.
- EIPHANIO, S; SINHORINI, IL; CATÃO-DIAS, JL. **Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates.** J Comp Pathol. 129:196–204, 2003.
- FELDMAN, HA. **A nationwide serum survey of United States military recruits, 1962. VI. *Toxoplasma* antibodies.** Am J Epidemiol. 81:385–91, 1965.
- FERNANDES, EFTS et al. **Study of *Toxoplasma gondii* in slaughtered swine in the state of Pernambuco, Brazil.** J Parasitol. In Press, 2012.
- FERREIRA, M.U. et al. ***Toxoplasma gondii* e toxoplasmose.** Fundamentos biológicos da parasitologia humana. Cap.3, p.17-25, 2003.
- FLORENCE, Robert-Gangneux e DARDE, Marie-Laure. **Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis.** Clin. Microbiol. Rev. 25(2):264, 2012.
- GLASNER, PD et al. **An unusually high prevalence Toxoplasmosis in Brazil 43 o ocular toxoplasmosis in southern Brazil.** Am J Ophthalmol. 114:136–44, 1992b.
- GOLKAR, M et al. **The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women.** Diagn Microbiol Infect Dis; 58:419 – 26, 2007.
- GRAS, L et al. **Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies.** Epidemiol Infect; 132:541 – 8, 2004.
- GRIGG, ME et al. **Sucess and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries.** Science, v. 294, p. 161-5, 2001.
- HILL, DE; CHIRUKANDO,TH S ; DUBEY JP. **Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals.** Diases Laboratory, 2005.

HUTCHISON, WM. **Experimental transmission of *Toxoplasma gondii***. Nature. 29 206 (987): 961-2, May 1965.

JACOBS, L; REMINGTON, JS; MELTON, ML. **The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii***. J Parasitol. 46:11-21, 1960.

JACOBS, L; REMINGTON, JS ; MELTON, ML. **A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma***. Journal for Parasitology. 46:23-8, Feb 1960.

JAMRA, LMF; GUIMARÃES, EC. **Conversão sorológica para toxoplasmose em crianças de um centro de saúde de São Paulo**. Rev Inst Med Trop São Paulo. 23:133-7, 1981.

JOHNSON, J et al. **Direct agglutination test and other assays for measuring antibodies to *Toxoplasma gondii***. J Clin Pathol; 42:536-41, 1989.

KEAN, BH et al. **An epidemic of acute toxoplasmosis**. J Am Med Ass; v. 208(6); pág. 1002-04, 1969.

KIJLSTRA, A; JONGERT, E. **Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat**. Int J Parasitol. 38:1359-70, 2008.

KIJLSTRA, A; JONGERT, E. **Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat**. Int J Parasitol. 38(12):1359-70, Oct 2008.

KONG, JT; GRIGG, ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. **Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides**. J Infect Dis. 187(9):1484-95, 2003.

KONG, JT et al. **Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides**. J Infect Dis, 187(9):1484-95, May 2003.

LAMAS DA SILVA, JML. **Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos**. Arq Esc Sup Vet. 12:425-8, 1959.

LAMB, GA; FELDMAN, HA. **A nationwide serum survey of Brazilian military recruits, 1964.III. *Toxoplasma* dye test antibodies**. Am J Epidemiol. 87:323, 1968 8.

LEHMAN, AF et al. **Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition**. American Journal of Psychiatry, 161, 1 -56, 2004.

LUCAS, SR et al. ***Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 41(4):221-4, Jul-Aug 1999.

MALUENDA, ACH et al. **Infecção aguda fatal por *Toxoplasma gondii* em macacobarigudo (*Lagothrix lagotricha*) – relato de caso**. Clin Vet. 81:100-4, 2009.

MATEUS-PINILLA, NE et al. **A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine.** J Parasitol; 85(5):855-60, 1999.

MECCA, JN; MEIRELES, LR ; de ANDRADE, HF Jr. **Quality control of *Toxoplasma gondii* in meat packages: standardization of an ELISA test and its use for detection in rabbit meat cuts.** Meat Sci. 88(3):584-9, Jul 2011.

MEIRELES et al. **Quantitative *toxoplasma gondii* oocyst detection by a modified Kato Katz test using Kinyoun staining (KKK) in ME49 strain experimentally infected cats.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 50(3):187-90, May-Jun 2008.

MEIRELES et al. ***Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs.** Trop Med Int Health. 9(8):876-81, Aug 2004.

MEIRELES, LR; GALISTEO, AJ ; ANDRADE, HF. **Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil.** J Vet Res Anim Sci,40:267–71, 2003.

MONTOYA, JG; LIESENFELD, O. **Toxoplasmosis.** THE LANCET Vol 363, June 2004.

MOURA, L et al. **Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene.** Emerg Infect Dis. 12(2): 326–329, Feb 2006.

MUNDAY, BL. **Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep.** Res Vet Sci;13:100-102, 1972.

MURADIAN, V et al. **A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil.** J Parasitol. 98:128–34, 2012.

NERY-GUIMARÃES, F; FRANKEN, AJ; CHAGAS, WA. **Toxoplasmose em primatas não humanos. Infecções naturais em “*Macacca mulatta*” e “*Cebus paella*”.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 69:77–87, 1971.

NÓBREGA, P; REIS, J. **Identidade dos toxoplasmas das aves e de mamíferos.** Arq Inst Biol (Sao Paulo). 13:21–8, 1942.

PASSOS, LMF; LIMA, JD; FIGUEIREDO BL. **Freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em Belo Horizonte, Minas Gerais.** Arq Bras Med Vet Zootec. 36:649–57, 1984a.

PELOUX, Y et al. **Direct agglutination test for toxoplasma. Role of immunoglobulins 19S and 7S. Preliminary notes.** Ann Biol Clin (Paris) ;31:185 – 92, 1973.

PENA, HF et al. **Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil.** Vet Parasitol. 175(3-4):377-81, Feb 2011.

PENA, HFJ et al. **Population structure and mousevirulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil.** Int J Parasitol; 38:561–9, 2008.

PENA, HF. **Toxoplasma gondii infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization.** Res Veterinary Science, v. 81, n. 1, p. 58-67, Ago 2006.

PESCADOR, CA et al. **Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil.** Pesq Vet Bras. 27:167– 71, 2007.

PEYRON, F et al. **Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America).** Microbes Infect. 8(9-10):2333-40, Aug 2006.

PFREPPER, KI et al. **Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis.** Clin Diagn Lab Immunol;12:977 – 82, 2005.

POMARES, C et al. **Toxoplasmosis and horse meat, France.** Emerg Infect Dis. 17(7):1327-8, Jul 2011.

RAGOZO, AMA et I. **Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed.** Vet Parasitol. 170:307–12, 2010.

RAGOZO, AMA et al. **Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State, Brazil.** J Parasitol. 94:1259–63, 2008.

RAGOZO, AMA et al. **Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil.** J Parasitol. 95:323–6, 2009.

REIS, J; NÓBREGA, P. **Toxoplasmose.** In: Reis J, Nóbrega P. Tratado de Doenças das Aves. São Paulo: Instituto Biológico. p.302–6, 1936.

REMINGTON, JS et al. Toxoplasmosis. In Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant.** 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; pág. 918–1041, 2011.

SAADATNIA, Geita e GOLKAR, Majid. **A review on human toxoplasmosis.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases; v 44; pág. 805–814, 2012.

SABIN, AB; FELDMAN, HA. **Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*).** Science. 108:660–3, 1948.

SANTOS, SL et al. **Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil.** Parasitol Res. 106:457-61, 2010b.

SANTOS, TR et al. **Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil.** Vet Parasitol. 161:324-6, 2009.

SICKINGER, E et al. **Performance characteristics of the new ARCHITECT Toxo IgG and Toxo IgG Avidity assays.** Diagn Microbiol Infect Dis; 62:235 – 44, 2008.

SILVA, JC et al. **Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil.** Journal of Parasitology 88, 419–420, 2002.

SILVA, KLMV; DE LA RUE, ML. **Possibilidade da transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil.** Cienc Rural. 36:892–7, 2006.

SILVA, MAS et al. **Detection of *Hammondia heydorni* and coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil.** Vet Parasitol.162:156–9, 2009.

SORGOB, F., et al. **Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres em São Paulo.** Rev. Inst. Med. Tropical- SP. São Paulo. V. 14, n. 5, p. 314-320,1972.

SOUSA, S et al. **Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping.** Clin Vaccine Immunol, 16(8):1158-69, Aug 2009.

SOUSA, S et al. **Use of GRA6- derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents.** Clin Vaccine Immunol, 15(9):1380-6, Sep 2008.

SOUSA, S et al. **Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals.** Vet Parasitol, 19;169 (1-2):24-8, Apr 2010.

SOUZA, W et al. **Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*.** Scientia Medica (Porto Alegre); v. 20, nº 1, pág. 131-143, 2010.

SPÓSITO, FE et al. ***Toxoplasma gondii* em eqüinos: estudo sorológico e tentativa de isolamento.** Biológico (Sao Paulo). 52:73–4, 1986.

SPÓSITO, FE et al. ***Toxoplasma gondii* em ovinos: isolamento do parasita a partir de diafragmas de animais procedentes do estado do Rio Grande do Sul abatidos em matadouros de São Paulo, para consumo humano.** Rev Bras Parasitol Vet. 1:117–9, 1992.

SPÓSITO, FE et al. ***Toxoplasma gondii* em caprinos: isolamento de cepas a partir de diafragmas de animais oriundos do estado da Bahia e abatidos em matadouros de São Paulo-Brasil.** Biológico (Sao Paulo). 49:199–206, 1983.

- SPRINGER, L. **Toxoplasmose epizootica entre pombos**. Arq Biol. 26:74–6, 1942.
- SU, C; ZHANG, X; DUBEY JP. **Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites**. Int J Parasitol; 36:841–8, 2006.
- TENTER, A M; HECKEROTH A R.; WEISS, L M.. **Toxoplasma gondii: from animals to humans**. International Journal for Parasitology 30, 1217±1258, 2000.
- TEUTSCH et al. **Epidemic Toxoplasmosis Associated with Infected Cats**. N Engl J Med. 300:695-699, 1979.
- TSUTSUI, VS et al. **Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs**. Arq Bras Med Vet Zootec. 59:30–4, 2007.
- TÚRY, F. **[Regional distribution of depression and suicide mortality]**. Orv Hetil. 4;140(14):803-4; author reply 805. Hungarian, Apr 1999.
- VENKATESAN, P.; WAKELIN, D. **ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs**. Parasitology Today, vol. 9. no. 6, 1993.
- VIDOTTO, O et al. **Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em eqüinos procedentes de quatro estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, PR**. Semina Cienc Agrar.18:9-13, 1997.
- VILLALOBOS, EMC et al. **Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de suínos de propriedades rurais do estado de São Paulo, Brasil**. Biológico (Sao Paulo), 73:129–80, 2011.
- VILLENA, I et al. **Detection of specific immunoglobulin E during maternal, fetal, and congenital toxoplasmosis**. J Clin Microbiol; 37:3487 – 90, 1999.
- WALLACE, GD. **Serological and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacific atolls**. Am J Epidemiol, 90:103-11, 1969.
- WEINMAN, D; CHANDLER, AH. **Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard**. Proc Soc Exp Biol Med. 87(1):211-6, Oct 1954.
- WEISS, LM; KIM, K. **Toxoplasma gondii: the model apicomplexan: perspectives and methods**. Illustrated ed. Academic Press; p. 367–86, 2007.
- WEISS, LM; DUBEY, JP. **Toxoplasmosis: A history of clinical observations**. International Journal for Parasitology 39, 895–901, 2009.
- YAI, et al. **Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil**. Vet Parasitol. 162:332–7, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7193 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br



São Paulo, 12 de setembro de 2013.

Ilmo. (a)

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
(aos cuidados de Cynara Marques de Almeida)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2013/201** "Padronização de ensaio imunoenzimático utilizando peptídeos sintéticos derivados de grânulos densos GRA6 e GRA7 de *Toxoplasma gondii*", sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna

Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

**ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
DA UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**



PARECER N.º 21 /2013

REGISTRO CEP UNISA N.º21 /2013 – PROJETO DE PESQUISA

Projeto de Pesquisa: "Padronização de ensaio imunoenzimático utilizando peptídeos sintéticos derivados de grânulos densos GRA6 e GRA7 de *Toxoplasma gondii*".

**Pesquisadores Responsáveis: Luciana R. Meireles Jaguaribe Ekman
Cynara Marques de Almeida**

Curso:

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **RETIRADA DE PAUTA** do Projeto " **Padronização de ensaio imunoenzimático utilizando peptídeos sintéticos derivados de grânulos densos GRA6 e GRA7 de *Toxoplasma gondii*".**

- **Este CEUA está ciente da aprovação da pesquisa pelo CEUA – IMT (Instituto de Medicina Tropical)**

São Paulo, 09 de outubro de 2013.

PROFA. DRA. ANDREA BARBOSA

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade de Santo Amaro