

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***Toxoplasma gondii* EM GALINHAS DOMÉSTICAS:
EPIDEMIOLOGIA, ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

TESE DE DOUTORADO

Giovana Camillo

Santa Maria, RS, Brasil,

2015

***Toxoplasma gondii* EM GALINHAS DOMÉSTICAS:
EPIDEMIOLOGIA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

Giovana Camillo

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração de Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS, Brasil,

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Camillo, Giovana
Toxoplasma gondii em galinhas domésticas:
epidemiologia, isolamento e caracterização molecular. /
Giovana Camillo.-2015.
87 f.; 30cm

Orientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. Galinhas 2. Oocistos 3. Epidemiologia 4. Genótipos
5. RFLP I. Vogel, Fernanda Silveira Flores II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Giovana Camillo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: giovanacamillo@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

***Toxoplasma gondii* EM GALINHAS DOMÉSTICAS:
EPIDEMIOLOGIA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

elaborada por
Giovana Camillo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)
(Presidente/orientador)

Luis Antonio Sangioni, Dr. (UFSM)

Maristela Lovato, Dr. (UFSM)

Larissa Picada Brum, Dr. (UNIPAMPA)

Dauton Luiz Zulpo, Dr. (PUC-PR)

Santa Maria, 04 de Março de 2015.

*Dedico meu doutorado aos meus pais que sempre
me incentivaram a trilhar o melhor caminho.*

Ao David, pelo amor e paciência a mim dedicados.

*Aos eternos amigos e colegas, Ivan Munchen e Andressa Ferreira,
pessoas muito especiais, que puderam apenas participar do início
deste trabalho ,mas sempre com muito anseio de auxiliar.*

*Ficaram as boas recordações da breve convivência
com vocês, antes de partir para outro plano da vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço a vida, a saúde e a oportunidade de buscar a realização dos meus ideais, colocando em meu caminho pessoas capazes de me instruir para meu crescimento.

À minha orientadora, professora Fernanda Silveira Flôres Vogel, pela amizade, confiança, por sempre ter me apoiado em momentos felizes e difíceis ao longo destes 10 anos de minha trajetória no LADOPAR. Muito obrigada por tudo, serei sempre grata !

Ao professor Luís Antônio Sangioni, pela amizade e confiança. O meu muito obrigada por ter proporcionado meu primeiro estágio em Londrina, onde tive meu primeiro contato com as pesquisas de toxoplasmose.

Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFSM, bolsistas e pós-graduandos, aos quais sempre pude ter como uma extensão da minha família, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade demonstrada. Em especial a Patrícia, Maiara, Caroline, pela amizade e auxílios sempre que precisei e à Marta Elena pela grande ajuda e sempre total disposição em todos momentos do experimento. Ao amigo Gustavo Cadore, pela disposição de sempre e pelos conhecimentos compartilhados. À Valdete, minha amiga especial que esteve presente nesta trajetória, sempre disposta a ajudar de alguma forma. A todos, o meu super obrigada pelos momentos compartilhados.

Aos professores Agueda Castagna de Vargas e Paulo Bayard D. Gonçalves por ter disponibilizado a estrutura física, bem como alguns equipamentos de seus laboratórios para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Ao professor Rudi Weiblen pela disposição e por todo empenho com o Projeto do Mercosul, pelo qual tornou possível a realização de parte deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Immunoparasitología da Universidad Nacional de La Plata pelos grandes momentos compartilhados. À professora Maria Cecília Venturini que abriu as portas para que pudéssemos desenvolver parte do projeto em La Plata, pela disposição e atenção de sempre. Em especial à Lais Pardini por toda ajuda, conhecimentos compartilhados, paciência e pela grande amizade.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia da UEL, Londrina, Dauton Zulpo e Luiz Daniel de Barros, pela disposição e conhecimentos compartilhados. O meu agradecimento especial ao Daniel, que não mediu esforços para ajudar nesta última fase do experimento, com toda humildade e competência. Muito obrigada pela parceria de vocês!

A Fernanda Rezer de Menezes por toda disposição e empenho nas análises estatísticas, que muito contribuíram para a concretização deste trabalho.

À minha família, em especial meu pai João Roque e minha mãe Terezinha, por nunca terem medido esforços para eu chegar até aqui. Obrigada por todos ensinamentos, os quais com certeza sempre fizeram com que buscasse seguir o caminho do bem, da honestidade e da ajuda ao próximo. Obrigada, pela compreensão, principalmente nas horas em que me fiz ausente. Ao Elizandro e a Camila, agradeço pelo incentivo e por terem trazido ao mundo o Bernardo, meu sobrinho e afilhado que muito me motiva e traz alegrias.

Ao David, meu companheiro, noivo, amigo, pelo amor, carinho, pela compreensão de todos momentos que estive longe, por ter esperado, por ter me ajudado, pela paciência. naqueles dias difíceis, enfim, por ter acreditado que eu chegaria até aqui.

Aos amigos que sempre tiveram presentes nesta trajetória, minha família do coração, André e Cirlei Blos, obrigada pelo incentivo, carinho e pela sincera amizade. Às amizades de sempre, Betina, Angela, Laura, Claudia, Simone, Rosangela pelo carinho, compreensão e preocupação à mim dispensadas.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária desta instituição, pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha formação. Em especial agradeço a secretária do PPGMV, Maria, pelo trabalho que desempenha sempre com muita competência e que muito contribui para chegarmos nesta etapa final.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos os verdadeiros amigos, que de forma direta ou indireta estiveram ao meu lado dando apoio, incentivo e estímulo nas horas boas e difíceis, minha eterna gratidão.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”.*

(Martin Luther King)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

***Toxoplasma gondii* EM GALINHAS DOMÉSTICAS: EPIDEMIOLOGIA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

AUTOR: GIOVANA CAMILLO
ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
Santa Maria, 04 de Março de 2015.

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* são dois protozoários intracelulares obrigatórios e podem infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo aves. Galinhas domésticas podem ser consideradas sentinelas da infecção, já que as mesmas têm potencial à exposição aos oocistos presente no solo, servindo como indicadores de contaminação ambiental, atuando também como eficiente fonte de infecção do *T. gondii*. Além disso, galinhas infectadas com oocistos de *T. gondii* podem albergar cepas virulentas deste parasito em diferentes tecidos, sem apresentar sinais clínicos. Diante disso, os objetivos deste estudo foram (1) determinar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*Neospora caninum* em galinhas domésticas criadas extensivamente em zona rural, (2) avaliar a associação dos fatores de risco para infecção por *T. gondii* presentes nas propriedades em uma das regiões de estudo (3) isolar o protozoário *T. gondii* a partir de tecidos de galinhas anticorpo positivas e (4) caracterizar genotipicamente os isolados de *T. gondii* de galinhas em área rural do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Primeiramente, em Maio de 2011 foram coletadas 137 amostras de sangue de galinhas em algumas propriedades rurais do estado e foram testadas por Imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum*, sendo detectados 74.4% (102/137) e 36.5% (50/137) das galinhas, respectivamente. Posteriormente, no período de março de 2013 a fevereiro 2014 foram coletadas 597 amostras de sangue de galinhas em 74 propriedades da zona rural de Santa Maria, RS.. As amostras foram testadas por RIFI, onde 49,2% (294/597) foram positivas para anticorpos anti-*T. gondii*, com títulos variando de 16 a 4096. A partir do bioensaio de tecidos de 12 galinhas positivas, obteve-se nove isolados do protozoário. A caracterização genotípica dos isolados foi realizada através da técnica de PCR-RFLP, utilizando os 11 marcadores genéticos, SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico. O resultado da análise genotípica dos isolados de galinhas do presente estudo revelou a presença de cinco genótipos de acordo com o ToxoDB (#11, #55, #64, #140 e #163), além de dois outros novos, não descritos anteriormente na literatura. A elevada prevalência de anticorpos encontrada neste estudo, sugere uma grande contaminação ambiental, sendo assim um risco potencial para a saúde humana e animal. A partir dos resultados obtidos na caracterização genotípica, pode-se observar que há uma ampla diversidade genética do *T. gondii* na região de estudo, o que confirma os estudos já realizados no Brasil.

Palavras-chave: Galinhas. Oocistos. Epidemiologia. Genótipos. RFLP.

ABSTRACT

Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

***Toxoplasma gondii* IN FREE RANGE CHICKENS: EPIDEMIOLOGY, ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION**

AUTHOR: GIOVANA CAMILLO
ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
Santa Maria, March, 4th, 2015.

Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* are two obligate intracellular protozoa and can infect a wide variety of hosts, including birds. Domestic chickens can be considered as sentinels of infection, since they have potential exposure to oocysts in the soil, serving as indicators of environmental contamination, also acting as an efficient source of *T. gondii* infection. In addition, chickens infected with *T. gondii* oocysts may contain virulent strains of this parasite in different tissues, without any clinical signs. Therefore, the objectives of this study were (1) to determine the presence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* in domestic chickens raised extensively in rural areas, (2) evaluate the association of risk factors for infection by *T. gondii* present in properties in one of the study regions (3) isolating of the parasite *T. gondii* from tissues of chickens antibody positive (4) genotypically characterize the *T. gondii* from rural area of the municipality of Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil. Firstly, in May 2011 were collected 137 blood samples in some farms in the state and were tested by indirect immunofluorescence (IFA) for antibodies anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* and were detected in 74.4% (102/137) and 36.5% (50/137) of chickens, respectively. Later in the period from March 2013 to February 2014 were collected 597 blood samples from 74 properties in the rural area of Santa Maria, RS. The samples were tested by IFA, where 49.2% (294/597) were positive for antibodies anti-*T. gondii* infection, with titers ranging from 16 to 4096. From bioassay of 12 positive tissues chickens were obtained nine isolates of the parasite. Genotypic characterization of isolates was performed by PCR-RFLP, using 12 genetic markers, SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, apical. The result of analysis of the genotype of individual of this study revealed the presence of five genotypes according to ToxoDB (# 11, # 55, # 64, # 140 and # 163) plus two new ones, not previously described in literature. The high prevalence of antibodies found in this study suggests a major environmental contamination, and thus a potential risk to human and animal health. From the results in genotypic characterization, it can be observed that there is a wide genetic diversity of *T. gondii* in the study region, which confirms previous studies in Brazil.

Keywords: Toxoplasmatineos. Free range chickens. Oocysts. Epidemiology. Genotypes, RFLP

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- FIGURA 1 – Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com a localização do município de Santa Maria. Em destaque o mapa de Santa Maria, localizada no centro do estado, composto por nove distritos que compreendem a zona rural e caracterizam os estratos..... 51
- FIGURA 2 – Frequência de contaminação das propriedades nos nove distritos pesquisados. Letras distintas representam diferença estatística com 90% de confiança pelo teste de qui-quadrado 52

CAPÍTULO III

- FIGURA 1 – Disposição dos isolados em árvore filogenética criada a partir do método e *neighbor-joining*. Os isolados de Santa Maria estão em vermelho..... 67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- TABELA 1 – Análise univariada para os fatores de risco associados ou não à contaminação por *T. gondii* em galinhas naturalmente infectadas em propriedades da zona rural do município de Santa Maria 53
- TABELA 2 – Frequência de anticorpos anti-*T. gondii* detectados através da reação de imunofluorescência indireta em galinhas domésticas de nove distritos, da zona rural de Santa Maria, RS 55

CAPÍTULO III

- TABELA 1 – Primers para PCR- multiplex, nested-PCR e enzimas utilizadas na RFLP 68
- TABELA 2 – Título de anticorpos de galinhas submetidas ao bioensaio e resultado do bioensaio em camundongos 69
- TABELA 3 – Caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) naturalmente infectadas na zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil 70

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Ficha epidemiológica – toxoplasmose na zona rural de Santa Maria - RS 84

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Folder – Informativo sobre toxoplasmose.....	87
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Histórico	18
2.2 Etiologia	18
2.3 Epidemiologia	19
2.3.1 Ciclo de vida e transmissão	19
2.3.2 Hospedeiros	20
2.3.2.1 Felinos	20
2.3.2.2 Galinhas	21
2.3.2.3 Ovinos e Caprinos	22
2.3.2.4 Suínos	23
2.3.2.4 Bovinos	23
2.3.2.5 Equinos	24
2.3.2.6 Cães	24
2.4 Diagnóstico	25
2.4.1 Diagnóstico Indireto	25
2.4.1.1 Reação de imunofluorescência indireta	25
2.4.1.2 Teste de aglutinação modificado - MAT	26
2.4.1.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA.....	26
2.4.1.4 Sabin-Feldman	26
2.4.2 Diagnóstico Direto	27
2.4.2.1 Bioensaio e isolamento	27
2.4.2.2 Histopatológico e Imunoistoquímica.....	27
2.4.2.3 Diagnóstico molecular	28
2.4.2.3.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR) e <i>Nested-PCR</i>	28
2.4.2.3.2 Microssatélites.....	29
2.4.2.3.3 Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos - RFLP	29
2.5 Caracterização genotípica - molecular	30
2.5.1 Diversidade Genética	30
3 CAPÍTULO I – Nota científica	34
<i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Neospora caninum</i> antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul, Brazil	34
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	35
MATERIALS AND METHODS	36
RESULTS AND DISCUSSION.....	36
REFERENCES	38
4 CAPÍTULO II – Artigo científico	41
Prevalência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em galinhas domésticas da zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil	41
ABSTRACT	41
RESUMO	42
INTRODUÇÃO	43

MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	48
5 CAPÍTULO III – Artigo científico.	56
Genotipagem de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos de galinhas domésticas (<i>Gallus gallus domesticus</i>) da zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil ...	56
ABSTRACT.....	56
RESUMO.....	57
INTRODUÇÃO.....	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS	60
DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS	83
ANEXO 1 – Ficha epidemiológica – toxoplasmose na zona rural de Santa Maria - RS .	84
APÊNDICES	86
APÊNDICE 1 – Folder – Informativo entregue aos proprietários, sobre toxoplasmose.	87

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, sub-família Toxoplasmatinae (DUBEY et al., 2002).

A toxoplasmose é uma importante zoonose que pode causar abortos, má formação fetal e doença ocular em humanos (TENTER et al., 2000). Nos animais de produção, a doença é caracterizada por distúrbios reprodutivos e gera perdas econômicas, principalmente em ovinos, caprinos e suínos, que são consideradas as espécies mais susceptíveis (GARCIA et al., 1999; SILVA et al., 2003; PESCADOR et al., 2007b; MILLAR et al., 2008). Diversas espécies de aves são infectadas pelo parasito, entretanto, na maioria das vezes, a infecção cursa de forma assintomática (DUBEY, 2002).

Muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de correlacionar a prevalência de *T. gondii* em galinhas caipiras com a contaminação ambiental com oocistos. Galinhas domésticas, de fundo de quintal, são consideradas boas indicadoras e podem atuar como sentinelas do *T. gondii*, uma vez que, mesmo albergando o parasita, não demonstram sinais clínicos. Dessa forma, o estudo do parasita, a partir de galinhas caipiras anticorpo positivas para *T. gondii* tem sido uma metodologia amplamente utilizada nos mais diferentes países, buscando reforçar dados referentes à epidemiologia, a importância desta espécie como hospedeira, além de buscar novos isolados e caracterizá-los genotipicamente.

Dessa maneira, os objetivos deste estudo foram (1) determinar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em galinhas domésticas criadas extensivamente em zona rural, (2) avaliar a associação dos fatores de risco presentes com a presença do *T. gondii* nas propriedades em uma das regiões de estudo (3) isolar o protozoário a partir de tecidos de galinhas anticorpo positivas e (4) caracterizar genotipicamente os isolados de *T. gondii* de galinhas naturalmente infectadas em área rural do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos e estão disponíveis nos próximos capítulos. O capítulo I corresponde à nota científica aceita para publicação na Brazilian Journal of Poultry Science; o capítulo II ao artigo submetido a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira e o capítulo III que será submetido, e encontra-se nas normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira. As considerações finais

trazem um apanhado do que foi discutido nos 3 capítulos, bem como as conclusões deste estudo.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA desta tese.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Toxoplasma gondii é um dos parasitas mais estudados, pela sua importância tanto em medicina humana, quanto veterinária. As condições ambientais, os hábitos culturais de uma população ou etnias e a própria fauna constituem alguns dos fatores que podem explicar a variabilidade desta infecção em diferentes áreas geográficas de um determinado país (DUBEY, 2009c).

2.1 Histórico

Primeiramente descrito por Splendore (1908), o qual isolou o parasita em um coelho de laboratório em São Paulo, classificando-o como *Toxoplasma cuniculli*. Posteriormente Nicolle & Manceaux (1908) no Instituto Pasteur de Túnis na Tunísia descreveram em um roedor (*Ctenodactylus gundi*) da África do Sul, e classificaram inicialmente como *Leishmania gondii* e em 1909, reclassificaram como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909). Até a década de 30, somente os estágios assexuados (merozoíto e cisto tecidual) do *T. gondii* eram conhecidos. Evidências com relação às características coccidianas foram observadas somente no final da década de 60, revelando similaridade entre os merozoítos extra-intestinais e intestinais de *Eimeria* (TENTER et al., 2000). Apesar de ter sido identificado no início do século 20, só na década de 70 é que foram descritos os hospedeiros definitivos e intermediários (FRENKEL et al., 1970; MILLER, et al., 1972).

2.2 Etiologia

A toxoplasmose é causada por um parasita intracelular obrigatório, pertencente ao subfilo Apicomplexa, classe Coccidia, Família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, classificado como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909). O parasita compreende três linhagens clonais (I,II,III), sendo que os tipos II e III são geralmente associados com a doença em animais e o tipo I é predominantemente encontrado em humanos (HOWE & SIBLEY, 1995; KHAN et al., 2006). A cepa padrão virulenta RH (SABIN, 1943) é do tipo I e pode ser considerada a mais patogênica. É a cepa mais utilizada frequentemente na pesquisa e diagnóstico, pois é de rápida replicação, alta produtividade e eficiência em lisar as células do hospedeiro, o que facilita o isolamento de um grande número de taquizoítos.

Outras cepas padrão, por exemplo, a cepa Me49 (tipo II) e VEG (tipo III) têm sido frequentemente empregadas em estudos relacionados com infecção latente, já que se caracteriza pela formação de cistos e por serem menos patogênicas (ROOS, et al., 1994).

2.3 Epidemiologia

2.3.1 Ciclo de vida e transmissão

O parasita *T. gondii* tem como hospedeiro definitivo os felídeos (domésticos e selvagens) e como hospedeiros intermediários animais de sangue quente, dos quais incluem vertebrados aéreos (pássaros), herbívoros e carnívoros terrestres (roedores, animais de caça, animais de produção e o homem), além de mamíferos marinhos (baleias e golfinhos) (DUBEY, 2002a).

Existem três estágios de infecção do *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos e oocistos. Os taquizoítos são o estágio de multiplicação rápida do protozoário, responsáveis pela fase aguda da infecção. Esta fase ocorre dentro de 8 a 12 dias pós-infecção, com a invasão de vários tecidos pelos taquizoítos, sendo estes, capazes de atravessar barreiras teciduais como a hematoencefálica e placentária, atingindo o feto. Os bradizoítos são considerados como o estágio latente do parasito, ao contrário dos taquizoítos que possuem uma rápida multiplicação. É a fase que marca o início da infecção crônica, na qual sua multiplicação diminui drasticamente e o parasito pode manter a infecção por um longo período. A reativação da infecção latente pode ocorrer em vários tecidos, mas o mais importante clinicamente é o SNC, pelo risco do desenvolvimento de encefalite toxoplásmica (CARRUTHERS, 2002). Os felídeos liberam oocistos nas fezes 3 a 10 dias após a ingestão de bradizoítos, sendo necessários, mais de 18 dias quando ingerem oocistos (DUBEY, 1998a). Os oocistos são essenciais para o ciclo de vida do *T. gondii*, sendo que tanto gatos domésticos (*F. domesticus*) como selvagens podem excretar oocistos nas fezes (TENTER et al., 2000).

Os felinos podem infectar-se através da ingestão dos bradizoítos (cistos) de tecidos de roedores, por carne crua de outras espécies animais, pela ingestão de oocistos esporulados ou ainda por meio de transmissão transplacentária (DUBEY, 2003 a). A chave da epidemiologia da toxoplasmose parece ser os felídeos, sendo os únicos hospedeiros que apresentam a forma sexuada, dessa maneira excretam oocistos que contaminam areia e solo e quando esporulados são fontes duradouras de infecção (ARAUJO et al., 1998). Além disso, soma-se o fato de que

os felinos cobrem suas fezes, aumentando as condições de sobrevivência do oocisto. A presença dos oocistos no solo já foi relatada por vários autores, sendo que as condições ideais para que ocorra a esporulação são de alta umidade, maior tensão de oxigenação e temperatura elevada, podendo o oocisto permanecer infectante por até 18 meses (FRENKEL, 1971).

O homem pode infectar-se por três vias, sendo i. ingestão de oocistos, esporulados no meio ambiente (solo, areia, água), ii. ingestão de cistos teciduais viáveis, presentes na carne ou em subprodutos, sobretudo cruas e mal cozidas e iii. infecção transplacentária (FRENKEL, 1971 e 1973).

2.3.2 Hospedeiros

2.3.2.1 Felinos

Os felídeos excretam os oocistos depois de ingerir qualquer um dos três estágios do parasito (DUBEY et al., 1998a). Um gato pode liberar 20 milhões de oocistos por dia em aproximadamente 20 gramas de fezes (FAYER, 1981) e, após decomposição das fezes, a contaminação do solo pode ser de 100.000 oocistos/grama (FRENKEL et al., 1995). Todos os gatos domésticos são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, embora animais jovens, com até um ano de idade, excretem um número maior de oocistos nas fezes após terem ingerido cistos teciduais contendo o agente. Gatos adultos, primoinfectados, também eliminam oocistos, porém em menor quantidade e por um período mais curto (LINDSAY et al., 1997). Embora a maioria dos gatos que tiveram contato com *T. gondii* desenvolva imunidade e não volte a excretar significativa quantidade de oocistos, DUBEY e FRENKEL (1974) comprovaram que gatos soropositivos, frente a quadros de imunossupressão, podem retomar a grande eliminação desta forma. Posteriormente, DUBEY (1995) reinfetou gatos soropositivos, seis anos após terem soroconvertido, e 55% destes re-excretaram oocistos nas fezes, porém em quantidades bem inferiores à primoinfecção.

Os oocistos excretados nas fezes dos gatos são muito resistentes no ambiente, onde a esporulação acontece de 1-5 dias, e a seguir torna infectante para humanos e outros vertebrados. A excreção de oocistos diminui pelo desenvolvimento da resposta imune adaptativa do animal. O relativo tempo limitado de excreção de oocistos e a durabilidade da imunidade justificam os resultados negativos de algumas investigações coprológicas em gatos soropositivos (LAPPIN, 1996; DUBEY, 2009 c). Muitos gatos infectados são assintomáticos, sendo que a toxoplasmose clínica é frequentemente manifestada através de pneumonia, e

gatos que subsequentemente morrem, os sinais mais comuns são depressão e anorexia (DUBEY, 2008).

Em um levantamento de pesquisas relacionadas com a frequência de anticorpos anti-*T. gondii*, em diferentes espécies animais na região sul do Brasil, realizado por FIALHO et al., (2009), pode-se observar que em felinos a frequência de anticorpos varia de 10,2% a 84 %.

2.3.2.2 Galinhas

Galinhas (*Gallus gallus*) são aves cosmopolitas e são consideradas importantes hospedeiros intermediários para *T. gondii*, podendo também servir como indicadores de contaminação ambiental, tendo grande exposição aos oocistos (DUBEY, 2009c; DUBEY et al., 2002a). São animais que se infectam facilmente pelo protozoário, através de oocistos esporulados, excretados junto às fezes de felinos (RUIZ E FRENKEL, 1980).

As galinhas raramente apresentam sinais clínicos de toxoplasmose (DUBEY, 2010). Em infecções experimentais induzidas pela inoculação oral de oocistos de *T. gondii*, as galinhas permaneceram assintomáticas ou desenvolveram doença leve (BIANCIFIORI et. al, 1986; DUBEY et al., 1993; KANETO et al., 1997). Mais recentemente, foram descritos sinais nervosos em galinhas caipiras, sendo que a necropsia de um animal demonstrou cistos teciduais e taquizoítos nas lesões (DUBEY et al., 2007).

O parasita tem sido detectado significativamente em tecidos de galinhas soropositivas (DA SILVA et al., 2003; LEHMANN et al., 2006). *T. gondii* é mais frequentemente encontrado em galinhas caipiras do que em galinhas criadas de forma intensiva, uma vez que as primeiras estão mais expostas à contaminação ambiental por oocistos (DUBEY, 2010 a; DUBEY et al., 2005).

Segundo (DUBEY, 2009 c), em relação à detecção *T. gondii* em ovos, há relatos discrepantes na literatura. Um estudo descreve que taquizoítos de *T. gondii* podem ser isolados de ovos *in natura* postos por galinhas com infecção induzida experimentalmente (JACOBS E MELTON, 1966). Outros relatos demonstraram níveis muito baixos ou ausência de organismos viáveis em ovos de galinhas infectadas experimentalmente (BOCH et al., 1966; BIANCIFIORI et al., 1986). Entretanto é improvável que ovos de galinhas *in natura* sejam uma fonte de infecção para humanos (DUBEY, 2009 c).

No Brasil, estudos recentes com galinhas de vida livre, utilizando MAT e RIFI como técnicas sorológicas, encontraram valores de ocorrência que variaram de 3% a 66%. No RS, 38% das galinhas pesquisadas na região sul do Estado, apresentaram anticorpos anti- *T.*

gondii, sendo que o teste utilizado foi o MAT, com um ponto de corte de 1:10 (DUBEY et al., 2007a).

2.3.2.3 Ovinos e Caprinos

A toxoplasmose em ovinos foi descrita pela primeira vez por OLAFSON e MONLUX (1942), nos Estados Unidos, em uma ovelha com sinais nervosos, aumento de temperatura e rigidez muscular. No ano de 1950, *T. gondii* foi relatado como significativa causa de aborto em ovelhas (HARTLEY et al., 1954), sendo ainda hoje considerado de alta prevalência no mundo todo (DUBEY, 2009c).

Em ovelhas soropositivas podem ser encontrados um grande número de cistos teciduais nos tecidos (DUBEY e JONES, 2008). Ovinos e caprinos são frequentemente alimentados através de pastagens e, portanto tem um risco aumentado da infecção devido à contaminação ambiental com oocistos esporulados. Essas espécies são particularmente vulneráveis e se o ambiente encontra-se contaminado com oocistos, a soroprevalência pode exceder 90% (TENTER et al., 2000; SAMRA et al., 2007).

A alta prevalência da toxoplasmose em ovinos pode estar ligada a menor resistência desta espécie ao parasito e as próprias condições de exploração da ovinocultura que expõe estes animais a maior probabilidade de contato com os oocistos eliminados pelos felídeos (DUBEY et al., 2002c). Estudos recentes relatam que idade, sexo, sistema de manejo, contato com felinos, suplementação mineral e tipo de alimentação estão relacionados a fatores de risco para infecção toxoplásmica em ovinos (NETO et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; LOPES et al., 2010).

A região do nordeste do Brasil tem sido amplamente estudada, pois a caprinocultura e ovinocultura são atividades bastante exploradas na região e representam 91% e 55%, respectivamente, do efetivo do país (IBGE, 2006). Em Pernambuco, em rebanhos com histórico de perdas reprodutivas, foram encontrados 40,4% de animais soropositivos, onde desse total de animais infectados 43,88% eram fêmeas, o que é sugestivo que *T. gondii* é um importante causador de perdas reprodutivas nesse Estado (DA SILVA et al., 2003).

A associação de *T. gondii* com perdas reprodutivas em caprinos foi confirmada no sul do Brasil; onde o parasito foi identificado em amostras de aborto por meio de análise histopatológica, imunistoquímica e por *nested* PCR (Pescador et al., 2007b). Nesta mesma região, a frequência de anticorpos anti- *T. gondii* encontrada foi de 10% a 54,3% (FIALHO et al., 2009).

2.3.2.4 Suínos

A importância da toxoplasmose suína, além da questão clínica, está relacionada às perdas reprodutivas e às implicações em saúde pública, uma vez que estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida seja uma importante via de transmissão do *T. gondii* para a população humana (FIALHO e ARAÚJO, 2003).

No Brasil, em algumas localidades a ingestão de embutidos artesanais preparados com carnes desta espécie é uma via de transmissão importante, não só para os indivíduos que ingerem, mas também para aqueles que estão envolvidos com a sua preparação (SPALDING et al., 2005). Conforme FIALHO et al., 2009, a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos no sul do Brasil varia de 1,16% a 42,85%.

2.3.2.4 Bovinos

O protozoário *T. gondii* foi primeiramente isolado de tecido de bovino por SANGER et al. (1953). Esses animais são considerados susceptíveis à infecção, porém resistentes à doença induzida por *T. gondii* (ESTEBAN-REDONDO e INNES, 1997), não sendo considerados como bons hospedeiros. Embora os bovinos possam ser infectados com sucesso com oocistos de *T. gondii*, o parasita é eliminado ou reduzido a níveis não detectáveis em poucas semanas (DUBEY e JONES, 2008).

Mais recentemente DUBEY e JONES (2008) e KIJLSTRA e JONGERT (2008) consideraram a transmissão de bovinos como não sendo importante para a infecção em humanos.

Embora sejam frequentemente resistentes à infecção, sinais de febre, anorexia, diarreia e descarga nasal podem ocorrer (SANGER et al. 1953, DUBEY 1983, OLIVEIRA et al. 2001). As manifestações clínicas da doença em animais de produção não são consideradas um problema de saúde pública, devido à baixa prevalência (DUBEY e JONES, 2008).

Estudos realizados sobre a frequência da infecção em bovinos no Brasil tornam possível afirmar que a toxoplasmose encontra-se amplamente disseminada nos rebanhos, embora as porcentagens possam variar de acordo com a região. A alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de bovinos vem sendo relatada desde 1978 por COSTA et al. (1978) que encontraram 32,3% de soropositivos no estado de São Paulo e 12% de reagentes em Minas Gerais, sendo que em ambas as pesquisas a técnica utilizada para pesquisa dos anticorpos anti-*T. gondii* foi a RIFI. COSTA et al. (2001) ao analisarem o soro

de bovinos provenientes de áreas rurais de São Paulo e Minas Gerais e DAGUER et al. (2004) no estado do Paraná, ambos por meio da RIFI, e considerando positivos os soros com titulação maior ou igual a 64, observaram que 49,1% e 41,4%, respectivamente, dos bovinos foram sororeagentes.

2.3.2.5 Equinos

Os eqüinos parecem ser uma das espécies mais resistentes no desenvolvimento clínico da toxoplasmose (AL-KHALIDI e DUBEY, 1979). Entretanto, sinais clínicos caracterizados por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e abortos já foram relatados (DUBEY e PORTEFIELD, 1986; TURNER e SAVVA, 1991). A prevalência do *T. gondii* em eqüinos provavelmente é muito baixa, DUBEY et al. (1999), sendo assim consideram-se que o risco de contrair a infecção através do consumo da carne desses animais não teria uma importância epidemiológica significativa. No entanto, em um recente estudo na Itália, o parasita foi detectado em 90% das amostras de carnes analisadas. Em alguns países, a carne de equinos é consumida crua e, dessa forma, desempenha um importante papel na epidemiologia do *T. gondii* (TASSI, 2007).

Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil buscam esclarecer o papel desses animais na infecção pelo *T. gondii*. O que tem sido observado é que a prevalência da doença varia de acordo com a localidade. Assim na região centro-oeste existe uma variação de 13,7% a 32,8% de animais anticorpo-positivos (LARANJEIRA et al., 1985; VIDOTTO et al., 1997); na região sudeste o percentual encontra-se entre 4,42% a 41,5% (COSTA et al., 1986; VIDOTTO et al., 1997) e na região sul 12,1% a 23,4% (VIDOTTO et al., 1997; GARCIA et al., 1999). MENDONÇA et al. (2001) encontrou no estado da Bahia, apenas 1,5% sororeagentes para *T. gondii*. Os autores explicam a baixa prevalência nos eqüídeos testados pode ser atribuída à resistência natural desta espécie à infecção pelo *T. gondii* e/ou a condições ambientais desfavoráveis na região para a disseminação do agente.

2.3.2.6 Cães

Desde o primeiro caso fatal de toxoplasmose canina, que foi descrito por MELLO em 1910, em um cão na Itália, houveram muitos outros relatos até 1988. Nos últimos 20 anos, tem se reduzido o número de casos, por dois motivos: (1) atualmente a maioria dos cães recebe a vacina contra o vírus da cinomose. Este vírus tem a característica de comprometer a

resposta imune do animal e, juntamente com uma infecção pré-existente por *T. gondii*, desencadear uma coinfeção mista que pode levar o animal a óbito; (2) outro motivo para essa redução foi os inúmeros casos de neosporose diagnosticados após a classificação do protozoário *N. caninum*, em 1988 e que na maioria das vezes era classificado como *T. gondii* (DUBEY, 2009c).

Segundo levantamento de FIALHO et al., 2009 a frequência de detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cães no sul do Brasil, apresentou uma variação de 4,96% a 84,1%.

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Diagnóstico Indireto

Ensaios sorológicos permitem alto rendimento com baixos custos e são muito utilizados para triagens. Embora os parasitas não sejam detectados diretamente, a sorocorrência pode mostrar uma indicação para o risco da infecção humana e de determinadas espécies anti-*T. gondii* positivas (GAMBLE et al., 2005). O primeiro teste disponível para detectar anticorpos específicos anti-*T. gondii* foi a reação de Sabin-Feldman (*dye test*). Cinquenta anos depois da sua descrição, ainda é considerado um teste de referência com alta taxa de sensibilidade e especificidade. Atualmente, outros testes são empregados como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de aglutinação modificado (MAT). Um estudo revelou que o MAT tem alta sensibilidade, seguido do ELISA, enquanto que a RIFI demonstrou menor sensibilidade. Por outro lado, RIFI tem alta especificidade, seguido por MAT e ELISA (SHAAPAN et al., 2008).

2.4.1.1 Reação de imunofluorescência indireta

A reação de imunofluorescência indireta é um teste simples que pode ser facilmente realizado. Para isso, se faz necessário o uso de antígenos, taquizoítos tratados com formalina, além de conjugados espécie-específicos (SHAAPAN et al., 2008). A variabilidade da sensibilidade e especificidade varia principalmente quanto à subjetividade em interpretar a reação de fluorescência, o que torna difícil, por exemplo, a comparação de resultados de diferentes laboratórios. Esta é a razão para diversos dados na literatura que demonstram uma extrema variabilidade na mesma região de estudo (SHAAPAN et al., 2008; MACRÍ et al., 2009). A RIFI apresenta algumas vantagens em relação aos demais testes sorodiagnósticos: i.

menor custo, ii. independe de determinados equipamentos (leitores, lavadores de placas); iii. permite a titulação de anticorpos. Porém, a dificuldade de automação, dependência de cultivos celulares e de equipamento específico (microscópio de fluorescência), além da necessidade de técnicos treinados para a leitura, são algumas desvantagens deste método (SHAAPAN et al., 2008).

2.4.1.2 Teste de aglutinação modificado - MAT

O teste de aglutinação modificada (MAT) é a forma de diagnóstico que pode ser utilizada em qualquer espécie animal, sendo considerado o teste de eleição para o diagnóstico em espécies silvestres, devido a sua facilidade de uso e principalmente por não requerer conjugado espécie-específico (SHAAPAN et al., 2008). O MAT é um teste que apresenta elevada sensibilidade e especificidade, além de ser prático e dispensa o uso de equipamentos sofisticados (CENCI-GOGA et al., 2011).

2.4.1.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) é considerado um método de fácil aplicação, e de alta sensibilidade e especificidade, além de proporcionar a realização de um número maior de amostras, podendo ser automatizado (CENCI-GOGA et al., 2011).

Muitos *kits* ELISA, estão disponíveis comercialmente para detecção de anticorpos em diferentes espécies animais. A metodologia, por ser automatizada, faz com que o teste se torne mais atrativo para o uso em estudos epidemiológicos de larga escala. Nos mais recentes testes introduzidos no mercado, os fabricantes declararam uma sensibilidade e especificidade maior que a RIFI e outros testes sorológicos (HOSSEININEJAD, et al, 2009).

2.4.1.4 Sabin-Feldman

Introduzido em 1948, um dos primeiros testes sorológicos desenvolvidos foi o Sabin-Feldman ou “Die Test” (DT). Sua realização depende do uso de taquizoítos vivos como antígeno, soro suspeito, fator acessório e azul de metileno; o teste possui boa sensibilidade e especificidade, mas deixou de ser utilizado como rotina, devido o uso de parasitos vivos, que aumenta o risco de contaminação do pessoal técnico. O DT é muito laborioso e tem a desvantagem da manutenção contínua de parasitos vivos (TENTER *et al.*, 2000).

2.4.2 Diagnóstico Direto

2.4.2.1 Bioensaio e isolamento

O isolamento de *T. gondii* por bioensaio em camundongos e gatos a partir de tecidos de galinhas naturalmente infectadas, tem sido descrito em vários países sendo, portanto, evidente a importância das galinhas na transmissão do parasito (DUBEY et al., 2009 a). Os órgãos mais frequentemente utilizados são coração, pulmão, baço e cérebro. Para a detecção de cistos teciduais nos órgãos dos hospedeiros, o método de digestão de tecidos e bioensaio em camundongos pode ser utilizado a fim de aumentar a taxa de recuperação do parasito (DUBEY, 1998 a; DUBEY et al., 1995). O bioensaio em camundongos é importante, pois o número de cistos em animais de grande porte é baixo, ao redor de um cisto por 25-250g de órgão. A digestão dos tecidos de um hospedeiro em pepsina, permite o exame de uma maior quantidade de material, levando a dissolução da parede dos cistos, liberando os bradizoítos. Um cisto de *T. gondii* contém quatro a centenas de bradizoítos, dependendo da amostra, hospedeiro e tempo de infecção (DUBEY, 1997 b; DUBEY et al., 1997; DUBEY & BEATTIE, 1988). As amostras virulentas de *T. gondii* são letais aos camundongos, induzem infecção aguda, sendo possível identificar grande quantidade de taquizoítos nos pulmões, líquido peritoneal e cérebro nos primeiros dias pós-infecção, quando parte desses animais vem a óbito. As amostras avirulentas produzem infecção crônica, sendo observados cistos no cérebro e produção e anticorpos específicos (DUBEY & BEATTIE, 1988).

T. gondii viáveis foram isolados de até 100% de galinhas caipiras, a partir de bioensaio em camundongos (Dubey, 2010). Em um experimento conduzido por DUBEY et al., 2002b, os oocistos esporulados foram fornecidos a galinhas pela via oral, foi demonstrado que cepas virulentas podem formar cistos teciduais porém, não apresentam sinais clínicos de toxoplasmose.

2.4.2.2 Histopatológico e Imunoistoquímica

Taquizoítos e cistos teciduais podem ser encontrados em secções de tecidos e órgãos potencialmente infectados pelo protozoário. A análise histopatológica é extremamente importante para caracterizar as lesões e a distribuição desta e assim a patogenia em diferentes hospedeiros naturais e/ou experimentais. No entanto, para a confirmação da identidade do

protozoário tendo em vista a semelhança morfológica com os protozoários apicomplexa a imunistoquímica se torna fundamental (DUBEY, 2009 c)

2.4.2.3 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares têm grande utilidade para a identificação de agentes infecciosos em tecidos e secreções de animais, possibilitando, em particular, a identificação de RNA ou DNA específicos de microorganismos, informações estas que não podem ser obtidas por meio dos testes imunológicos ou morfológicos (SINGH, 1997).

2.4.2.3.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR) e *Nested-PCR*

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é muito utilizada para detecção de DNA do parasita em sangue, fluídos e tecidos. Até 2002, muitos estudos baseavam-se na amplificação de genes com poucas cópias no genoma de *T. gondii*. Um dos mais utilizados era o gene SAG1, com apenas uma cópia, seguido pelo gene B1 com 35 cópias (LIN et al., 2000), DNA ribossomal com 110 cópias e, posteriormente, o 18S DNA ribossomal com 200 cópias (KIJESTRA et al., 2008). Atualmente, muitos estudos utilizam o gene repetitivo de 529 pares de base (HOMAN et AL., 2000), que apresenta de 200 a 300 cópias no genoma do parasito, além de ser altamente específico do ponto de vista analítico. Amostras de sangue testadas para se investigar parasitemia por ensaios de PCR, amplificando-se segmentos dos genes B1 e P30 de *T. gondii*, mostraram o potencial da técnica para o diagnóstico não-invasivo da toxoplasmose disseminada (DUPOY-CAMET et al., 1993; HO-YEN et al., 1992; SPALDING et al., 2002).

A especificidade da PCR é aproximadamente de 100 %, mas a dificuldade de extrair o DNA e concentrar amostra pode resultar em limitada sensibilidade (ALFONSO et al., 2009). O que pode ser considerado também é a distribuição do cisto que é aleatória e que a densidade dos mesmos pode ser muito baixa (PIERGILI FIORETTI, 2004; ALFONSO et al., 2009). Neste sentido, tanto para uma maior sensibilidade como para a caracterização molecular do *T. gondii*, a técnica de PCR pode ser melhorada com uma reação a mais, a *Nested-PCR*.

A técnica de *Nested-PCR* consiste na realização de duas reações de amplificação, sendo empregado um par de *primers* para cada reação. O emprego de duas amplificações sucessivas aumenta a sensibilidade da reação e tem sido usada com sucesso para a detecção específica de protozoários coccídios, principalmente em amostras de campo, que podem

conter quantidades diminutas do microorganismo alvo (ELLIS et al., 1999; MEDINA et al., 2006). Essa técnica tem sido utilizada para detecção de DNA de parasitas que infectam mamíferos e aves, mesmo quando estes animais apresentam-se soronegativos (SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2009; GONDIM et al., 2010).

2.4.2.3.2 Microssatélites

O uso de marcadores de microssatélites para estudos com *T. gondii* tendo sido mais recentemente utilizado para caracterização molecular. Este teste apresenta elevada capacidade discriminatória e sua utilidade para avaliar a estrutura genética populacional e molecular epidemiológica e para inferir relações filogenéticas a nível intraespecífico ou no caso de espécies divergentes (AJZENBERG, et al., 2002).

Microssatélites representam outra classe de marcadores genéticos e são caracterizados por repetições curtas de 2-6 nucleotídeos. Os marcadores gerados dessa repetição são conhecidos por serem altamente polimórficos, devido à variação no comprimento dessa repetição, e conseqüentemente, eles exibem múltiplos alelos, o que os torna bastante informativos em estudos genéticos. O polimorfismo pode ser avaliado por PCR, o que exige apenas uma pequena quantidade de DNA, e o alelo de dimensionamento pode ser obtido através de iniciadores fluorescentes e com um sequenciador automático que assegura a confiabilidade dos resultados (AJZENBERG, et al., 2004).

2.4.2.3.3 Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos - RFLP

Apesar do uso de microssatélites ser mais específico do que os outros métodos utilizados na genotipagem, a PCR-RFLP ainda é a técnica mais utilizada mundialmente, para caracterização genotípica de *T. gondii* (HOWE e SIBLEY, 1995; SU et al., 2009).

O polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genômico é um método que detecta variações mínimas em um gene, onde uma única substituição de bases pode criar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido por uma endonuclease (SINGH et al., 1997). RFLPs são encontrados como resultado da clivagem do DNA por enzimas de restrição, as quais reconhecem uma sequência específica de quatro, seis ou oito bases. Se houver uma mudança de uma única base dentro da sequência, a enzima não será capaz de clivar o DNA. Ao se clivar duas moléculas de DNA relacionadas, mas diferentes, com a mesma enzima de restrição, podem ser obtidos segmentos de comprimentos diferentes, que quando separados

em um gel, originam bandas de diferentes pesos moleculares (PENA, 2008). Sendo assim, o método consiste em clivar o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de pesos moleculares diferentes, permitindo a caracterização e diferenciação dos tipos das cepas (HOWE et al., 1997; KHAN et al., 2005; GRIGG et al., 2001 c).

Na pesquisa genética de *T. gondii*, com o desenvolvimento das técnicas moleculares, tornou-se possível amplificar *locus* genéticos específicos para a análise por RFLP a partir de um número muito pequeno de células, além de permitir a análise direta das amostras sem a necessidade de cultivo prolongado dos isolados, e uma possível alteração da amostra fora do seu hospedeiro original (SIBLEY et al., 1995).

Vários marcadores polimórficos já foram caracterizados, entre eles marcadores de antígenos de superfície (SAG 1, SAG 2, SAG 3, SAG 4, BSR4, SRS1), de antígenos constitutivos (GRA 1, GRA 2, GRA 3, GRA 4, GRA 6, ROP 1), de função ainda desconhecida (TUB1, B10, FOL1) e microssatélites (TUB 2, TGM-A) (DARDÉ, 2004). Em trabalho mais recente, SU et al., (2010) relata o uso de 12 marcadores moleculares, que atualmente estão sendo utilizados nos mais variados laboratórios como padrão de caracterização.

2.5 Caracterização genotípica - molecular

2.5.1 Diversidade Genética

Estudos genotípicos com *T. gondii*, demonstram uma população clonal com três principais linhagens relatadas a partir da virulência em camundongos (tipo I, II e III) (DARDE et al., 1988; SIBLEY e BOOTHROYD, 1992; HOWE e SIBLEY, 1995). Cepas do tipo I têm sido mais encontradas em humanos e assim, cepas tipo II e III predominam em animais (HOWE e SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997). Inicialmente, as cepas de *T. gondii* geneticamente caracterizadas foram da Europa e América do Norte, sendo que os isolados derivados de humanos foram a partir de casos clínicos, enquanto que cepas de *T. gondii* isoladas de animais foram isoladas de indivíduos assintomáticos (HOWE e SIBLEY, 1995; FUENTES et al., 2001). Alguns estudos sugerem que cepas tipo I ou recombinantes do tipo I e III são mais prováveis de resultar em toxoplasmose ocular clínica (GRIGG et al., 2001 b).

Estudos relacionados com polimorfismos genéticos de *T. gondii* utilizando inúmeros genes e diferentes *loci*, revelaram que as cepas e isolados de *T. gondii* de maior

patogenicidade são todas oriundas de um único clone ancestral, e que desde então, poucas recombinações genéticas ocorreram (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992; GRIG et al. 2001c).

Nos primeiros estudos de genotipagem de *T. gondii*, foi observado que mesmo diferindo em algumas propriedades biológicas, as amostras conhecidas foram similares antigenicamente e morfológicamente e na sua capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992). Apesar de sua distribuição cosmopolita, *T. gondii* apresentou baixa variação genética quando diferentes isolados foram analisados através da Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos de DNA,– RFLP (CRISTINA et al., 1991; SIBLEY e BOOTHROYD, 1992) ou marcadores isoenzimáticos (DARDÉ et al., 1992) revelando, nessas amostras, uma estrutura populacional altamente clonal (HOWE e SIBLEY, 1995).

Existem várias explicações para a existência da estrutura populacional clonal em *T. gondii*. Primeiro este parasita é capaz de transmitir entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro definitivo, felino, e sofrer meiose e recombinação sexual (HOWE e SIBLEY, 1995; SU et al., 2003). Segundo, muitos macrogametas do parasita permanecem infertilizados, mas são capazes de formar oocistos no intestino delgado dos felídeos através da partenogênese (FERGUSON, 2002). Terceiro, a recombinação ocorreria se felídeos fossem infectados simultaneamente com diferentes amostras de *T. gondii*, o que é um evento bastante raro de acontecer na natureza, uma vez que eles teriam que se alimentar de uma presa que albergasse infecção mista, ou se ingerissem duas presas, cada uma abrigando uma cepa diferente, porém, esse evento teria que acontecer em um intervalo de tempo bem curto. O que também pode contribuir para essa população clonal incomum, o fato de *T. gondii* ser haploide, ou seja, um felídeo infectado com apenas um tipo de amostra, produz oocistos contendo progêneses geneticamente idênticas à amostra infectante original (AJZEMBERG et al., 2004).

Esses estudos podem não refletir no verdadeiro *status* de *T. gondii* em áreas geográficas remotas ou em regiões tropicais onde o sistema ecológico é muito diferente do que essas regiões do mundo, já caracterizadas. Diversos estudos têm examinado a distribuição de genótipos em galinhas de muitos países como Egito, Argentina, Índia e Brasil (DUBEY et al., 2002 b, 2003 a-b; SREEKUMAR et al., 2003; LEHMANN et al., 2004), porém os estudos genéticos em geral se limitavam a poucos marcadores, como por exemplo o SAG2 (LEHMANN et al., 2004). As cepas atípicas raras foram caracterizadas somente em regiões tropicais como Guiana Francesa (BOSSI et al., 1998; DARDÉ et al., 1998; CARME et al., 2002), França (DARDÉ, 1996), Brasil (PENA et al., 2008) e em espécies hospedeiros

incomuns como veados, ursos ou baleias (HOWE e SIBLEY, 1995; COLE et al., 2000; LEHMANN et al., 2000; MILLER et al., 2004).

Estudos recentes com relação à diversidade genética, por técnicas moleculares altamente discriminatórias para *T. gondii*, têm mostrado que o parasita é muito diversificado geneticamente e não deve ser considerado como clone, como previamente suspeitado (LEHMANN et al., 2006; DUBEY e SU, 2009). Diferenças intercontinentais entre as cepas de *T. gondii* tem sido detectadas por análises de microsátélites (LEHMANN et al., 2006) e, mais recentemente, dados genotípicos das cepas que infectam galinhas, suínos, cordeiros e veados tem demonstrado alto nível de diversidade genética (DUBEY e SU, 2009).

Em um estudo para avaliar a presença de *T. gondii* em galinhas e a diversidade genética entre as cepas isoladas, foram observadas cepas com variados graus de virulência e uma frequência de animais soropositivos entre 2 a 100%. Razões para essa variabilidade podem ser muitas, incluindo idade das galinhas, número amostral e os tecidos utilizados no bioensaio (DUBEY, 2009 c).

No Brasil, o primeiro isolado tipificado foi uma amostra oriunda de um suíno de Erechim (RS), a amostra S-11, que foi classificada como tipo I (HOWE e SIBLEY, 1995). Atualmente, há alguns trabalhos que relatam a genotipagem do *T. gondii* em diferentes espécies animais e em humanos, o que têm se demonstrado fenotípica e genotipicamente diferente dos isolados da Europa e da América do Norte (DUBEY et al., 2002; 2003a, d., 2006b.; LEHMANN et al., 2006). Isolados do estado do Pará (norte) e Rio Grande do Sul (sul), distante aproximadamente 3.500 Km um do outro foram estudados. Para isso, foram utilizados 11 marcadores (SAG 1, SAG 2, SAG 3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG 2 e Apico). Dos 15 isolados do Pará, obtiveram 11 genótipos e sete genótipos diferentes foram obtidos dos 19 isolados do Rio Grande do Sul e não foram observadas infecções mistas. Os autores concluíram que o padrão genético do *T. gondii* nestas regiões é altamente diversificado dentro de um número relativamente pequeno de isolados, o que não é usual e as populações de *T. gondii* são distintas entre diferentes locais do Brasil (DUBEY et al., 2007a).

Quando genotipados um total de 149 isolados de *T. gondii*, de 13 diferentes áreas geográficas do Brasil, foi confirmado que o tipo clonal I é raro e cepas com linhagem clonal tipo II não foram encontradas, o que é um grande contraste se comparado com as cepas da América do Norte e Europa, onde são altamente predominantes (DUBEY et al., 2008; DARDÉ et al., 1992; AJZEMBERG et al, 2002). PENA et al. (2008), estudaram a estrutura populacional e a virulência para camundongos de 46 isolados de gatos e de outros 125

isolados brasileiros provenientes de galinhas, cães e outros gatos do Brasil, comparando os resultados obtidos para dez marcadores moleculares em diferentes espécies animais. Os resultados revelaram uma alta diversidade genética, sendo que quatro genótipos foram isolados em vários hospedeiros de diferentes origens geográficas, propondo-se então a denominação destas linhagens como BrI, BrII, BrIII e BrIV, representativas de linhagens clonais, sendo a linhagem BrI a mais virulenta, a BrIII não-virulenta e as demais de virulência intermediária. Recentemente, no Brasil, DUBEY et al. (2010), DA SILVA et al. (2011), MACEDO et al. (2012), através de genotipagem por *multilocus* PCR-RFLP descreveram o genótipo tipo II. Em galinhas da Ilha de Fernando de Noronha, em ovelhas de abatedouros em São Paulo e em vacas de leite prenhes de Santa Catarina, respectivamente. respectively. Dessa forma, concluiu-se que a população de *T. gondii* no Brasil é bastante diversificada com poucas linhagens clonais estabelecidas nas diferentes áreas geográficas do país já estudadas.

Assim, métodos para a caracterização genotípica do *T. gondii* com maior resolução que aqueles capazes apenas de reconhecer as três linhagens (I,II, III) são desejáveis (BLACKSTON et al., 2001; AJZEMBERG et al., 2002). Porém necessita-se de padronização dos marcadores utilizados para possibilitar comparações de genotipagem e atributos biológicos (SU et al., 2006) como vem sendo realizado através da PCR-RFLP no *locus* SAG 2 com amostras de humanos e animais no mundo todo.

Estudos epidemiológicos futuros, são indicados para determinar o papel de diversidade genética do *T. gondii*, a transmissão entre espécies, patogenicidade e resposta imunológica (BECK et al., 2009). Recentemente, diversos autores encontraram muitas linhagens em suínos e galinhas e postularam uma recombinação e eficiente transmissão por oocistos (DUBEY e SU, 2009; VELMURUGAN et al., 2009).

3 CAPÍTULO I – Nota científica

Aceita para publicação na *Brazilian Journal of Poultry Science*

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul, Brazil

Giovana Camillo¹, Gustavo Cauduro Cadore¹, Maiara Sanitá Tafner Ferreira¹, Patrícia Braünig¹, Jonas Fernandes Maciel¹, Felipe Lamberti Pivoto¹, Luís Antônio Sangioni¹,
Fernanda Silveira Flores Vogel¹

¹Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. Fone: 055-32208071. *Corresponding author: giovanacamillo@yahoo.com.br

ABSTRACT

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two intracellular apicomplexan protozoa with worldwide distribution, and are responsible for reproductive disorders in sheep and cattle. These protozoa may infect a wide variety of domestic and wild animals, including birds, and backyard chickens can be used as sentinels of their infection. Parasites investigation in backyard chickens may be useful for the evaluation of environmental contamination with oocysts, of the disease cycle, and of risk factors associated with public health. The aim of this study was establish the importance of backyard chickens as *T. gondii* and *N. caninum* hosts. A number of 137 serum samples were collected from chickens in 23 farms in Rio Grande do Sul State, Brazil, and tested for toxoplasmosis and neosporosis by indirect fluorescence antibody

¹Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. Fone: 055-32208071. *Corresponding author: giovanacamillo@yahoo.com.br

test (IFAT). Anti-*Toxoplasma* and anti-*Neospora* antibodies were detected in 20 (87%) farms. Total prevalence of *T. gondii* was 74.4% (102/137) and 36.5% (50/137) for *N. caninum*, while 12.4% (17/137) of the chickens were positive for both protozoa. The results show that backyard chicken can be used as indicators of the presence of the protozoa *N. caninum* and *T. gondii*, emphasizing its importance in public health. Considering the high prevalence of toxoplasmosis in backyard chickens in the region, control measures should be taken to prevent transmission of the infection to animals and humans.

Keywords: Backyard chickens, Neosporosis, Public health, Toxoplasmosis.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two apicomplexan protozoa and are biologically similar, and present worldwide, and cause reproductive failure in small ruminants and cattle (Dubey, 2002; Dubey & Schares, 2011). Toxoplasmosis is a parasitic zoonosis that affects a wide range of animals, including birds and man (Dubey, 2009). Neosporosis is an important cause of abortion in cattle and has significant economic impact in the dairy and beef industries (Trees *et al.*, 1999). *T. gondii* infections are prevalent in many avian species and can cause mortality in some species of birds (Dubey *et al.*, 2010). *N. caninum* has been found in a few species of naturally infected birds, and particularly in domestic chicken (Costa *et al.*, 2008) and in some wild birds (Darwich *et al.*, 2012). Chickens are intermediate hosts, especially those reared in backyard systems, where transmission occurs by the ingestion of oocysts from the soil that were shed by dogs and cats, which are the definitive hosts of *N. caninum* and *T. gondii*, respectively (Gondim, 2006; Dubey, 2009). For this reason, backyard chickens are considered indicators of environmental contamination with oocysts (Furuta *et al.*, 2007; Dubey, 2009). In order to help understanding the role of chickens in the

epidemiology these protozoa, the aim of the present study was estimate the seroprevalence of *T. gondii* and *N. caninum* in backyard chickens in southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Serum samples were collected from 137 clinically healthy backyard chickens from 23 farms in Rio Grande do Sul State, Brazil, between May and November 2011. Blood samples were collected by wing puncture. All samples were tested by indirect fluorescence antibody test (IFAT), for detection of *T. gondii* and *N. caninum* antibodies. The IFAT cut-off for *T. gondii* was 1:16 (Garcia *et al.*, 2000) and 1:50 for *N. caninum* (Costa *et al.*, 2008). The serum samples were diluted in phosphate buffered saline solution (PBS - 0.1M phosphate, 0.33M NaCl, pH 7.2), and positive and negative chickens for both protozoa were used as controls. IFAT was applied following the procedure described by Camargo *et al.* (2001). *T. gondii* and *N. caninum* tachyzoites, RH and NC-1 strains, respectively, were performed as antigens, . The commercial fluorescein-labeled anti-chicken IgY[®] (Sigma, St Louis, USA) was used as secondary antibody. Slides were read at x400 magnification under a fluorescence microscope (Leica CTR 4000/EBQ 100, Leica Microsystems, Germany). Samples with titers greater than 16 and 50 were considered positive for toxoplasmosis and neosporosis, respectively.

All procedures of animal handling and experimentation were performed under veterinary supervision and according to guidelines of Institutional Ethics and Animal Welfare Committee (UFSM, approved under protocol #009/2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Anti-*Toxoplasma* and anti-*Neospora* antibodies were detected in 20 (87%) of the 23 farms. In 19 (82.6%) out of the 23 farms, antibodies against *T. gondii* were detected, while

anti-*N. caninum* were detected in 14 (60.9%) out of the 23 farms. In the backyard chickens tested, antibodies against *T. gondii* were detected in 74.4% (102/137) chickens and against *N. caninum* in 36.5% (50/137) chickens. Mixed infections were found in 17 out of 137 backyard chickens tested (12.4%), and in 13 (56.5%) of the 23 farms. Therefore, 85 (62%) and 33 (24.1%) of the serum samples were positive only for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively.

We verified higher detection of the antibodies against *T. gondii* compared with *N. caninum* in chickens serum tested. Studies in different regions of Brazil showed that the seroprevalence of *T. gondii* ranged between 38% and 66% in chickens (Dubey, 2009). *T. gondii* infection has been extensively reported in birds, but only a few reports in backyard chickens showed their importance as hosts, which deserves further study (Tilahun *et al.*, 2013). As for *N. caninum*, Costa *et al.* (2008) and Martins *et al.* (2011) found 23.5% and 39.5% positive serum samples in backyard chicken respectively, indicating significant exposure to this protozoan. These results are epidemiologically important because chickens are cosmopolitan animals consumed by many animal species, including dogs and cats which are the definitive hosts of those parasites (McAllister *et al.*, 1998; Dubey, 2002).

Sources of infection for humans depend on local culture, geographical location, and eating habits differences, and *T. gondii* has been detected in different in various tissues of chickens (Tenter *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2004). *T. gondii* can be isolated from infected tissues of backyard chickens, and therefore, these birds may contribute for the epidemiological characterization of strains on the protozoan present in the environment (Dubey, 2009). Moreover, meat of infected backyard chickens may be a source of *T. gondii* infection of humans and animals. The presence of free-range poultry on dairy farms with abortions caused by neosporosis has been considered a risk factor for *N. caninum* infection in some studies (Bartels *et al.*, 1999; Ould-Amrouche *et al.*, 1999).

The presence of antibodies against *T. gondii* and *N. caninum* in backyard chickens may be used as an indication of the contamination of the environment with oocysts. Those birds feed on the ground and tissues of infected chickens are considered a source of infection of others animals, such as dogs and cats, allowing the life cycle of this protozoan to be completed (Costa *et al.*, 2008; Dubey, 2009).

The presence of antibodies for both parasites indicates the environmental contamination of the evaluated farms. Although chickens can be naturally infected by these protozoa, mainly *T. gondii* (Dubey, 2009), further studies are necessary to define the role of chickens in epidemiology of *N. caninum*. Backyard chickens are raised in the region where farms were evaluated for meat and egg production, and these products are consumed the households. The birds are slaughtered at home or in uninspected slaughter facilities. Meat and viscera of infected backyard chickens may be an important source of infection of humans and animals when improperly handled or consumed (Dubey, 2009). Considering the results, biosecurity measures in backyard production are required to prevent human infection. In conclusion, the results of the present study suggest that backyard chickens can be intermediate hosts of *T. gondii* and *N. caninum*, and their possible role in the maintenance of the life cycle of these protozoan. The results indicate a widespread exposure of backyard chickens to *T. gondii* and *N. caninum* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

REFERENCES

- Bartels CJ, Wouda W, Schukken YH. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1999). *Theriogenology* 1999;52(2):247-257.
- Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW & Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 278-286.

- Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MA, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LF. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 2008;38(2):157-159.
- Darwich L, Cabezón O, Echevarria I, Pabón M, Marco I, Molina-López R, Alarcia-Alejos F, López-Gatius F, Lavín S, Almería S. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. *Veterinary Parasitology* 2012;183(3-4):377-381.
- Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Veterinary Parasitology* 2002;106(2):121-153.
- Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Lehmann T, Davis MF, Morishita TY. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from United States. *The Journal of Parasitology* 2003;89(5):1060-1062.
- Dubey JP, Levy MZ, Sreekumar C, Kwoc OC, Shen SK, Dahl E, Thulliez P, Lehmann T. Tissue distribution and molecular characterization of chickens isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *The Journal of Parasitology* 2004; 90(5):1015-1018.
- Dubey JP. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses and Public Health* 2009; 57(1):60-73.
- Dubey JP, Felix TA, Kwoc OC. Serological and parasitological prevalence of *Toxoplasma gondii* in wild birds from Colorado. *The Journal of Parasitology* 2010;96(5):937-939.
- Dubey JP & Schares G. Neosporosis in animals – the last five years. *Veterinary Parasitology* 2011;180(1-2):90-108.
- Furuta PI, Mineo TW, Carrasco AO, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology* 2007;134:1931–1939.

Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Marana ERM. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural* 2000;30(1):123-127.

Gondim LF. *Neospora caninum* in wildlife. *Trends in Parasitology* 2006;22(6):247-252.

Martins J, Kwok OC, Dubey JP. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. *Veterinary Parasitology* 2011;182(2-4):349–351.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 1998;28(9):1473–1478.

Ould-Amrouche A, Klein F, Osdoit C, Mohammed HO, Touratier A, Sanaa M, Mialot JP. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy. *Veterinary Research* 1999;30(5):531-538.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM, *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 2000; 6 (12–13): 1217–1258.

Tilahun G, Tiao N, Ferreira LR, Choudhary S, Oliveira S, Verma SK, Kwok OC, Molla B, Saville WJ, Medhin G, Kassa T, Aleme H, Gebreyes WA, Su C, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens (*Gallus domesticus*) from Addis Ababa, Ethiopia. *The Journal of Parasitology* 2013;99(4):740-741.

Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology* 1999;29(8):1195-1200.

4 CAPÍTULO II – Artigo científico

Este capítulo originou um artigo submetido para publicação na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

Prevalência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas domésticas da zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil¹

Giovana Camillo^{2*}, Marta E. A. Machado², Augusto Weber², Gustavo C. Cadore²,
 Patrícia Bräunig², Fernanda R. Menezes³, Maria C. Venturini⁴, Lais Pardini⁴, Luis A.
 Sangioni², Fernanda S.F. Vogel²

ABSTRACT - Camillo, G., Alves, M. E. M., Weber, A., Cadore, G. C., Bräunig, P., Menezes, F., Pardini, L., Venturini, M. C., Sangioni, L. A., Vogel, F. S. F. [Antibodies to *Toxoplasma gondii* in free range chickens of rural area of Santa Maria, Rio Grande do Sul state] Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas domésticas de zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00, 2XXX. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: giovanacamillo@yahoo.com.br

Toxoplasma gondii is apicomplexa protozoan that can infect warm-blooded animals and is considered one of the main food-borne parasites for humans. Domestic chickens are infected by protozoa and can ingest oocysts found in soil, it being considered good indicators of *T. gondii* contamination. This study determined the presence of antibodies to *T. gondii* in domestic chickens from March 2013 to February 2014. Were collected 597 blood samples, from domestic chickens on 74 properties, derived from nine layers, representing each district of rural area of Santa Maria, RS, Brazil. The serum samples were analyzed by indirect fluorescent antibody test at 1:16 dilution, which is considered positive cutoff. From total 597 serum samples, 49.2% (294/597) were positive for *T. gondii*, with titers ranging from 16 to

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. *Autor para correspondência: giovanacamillo@yahoo.com.br

³ Departamento de Estatística, Pós-Graduação em Estatística e Modelagem Quantitativa Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Laboratorio de Immunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296 (1900), La Plata, Argentina.

4096. Of the 74 properties analyzed, in 63 (85.1%) there were reports that cats have access to food deposit, with significant association when associated with the presence of positive chickens ($p = 0.04$) and the OR of 4.07. The variable "slaughter of animals" (poultry and cattle) in 51 (68.9%) of the properties was reported the slaughter of cattle and poultry on the property, with significant p value ($p = 0.05$). The majority of properties 59 (79.7%) reported the presence of domestic cats, which could be associated with high prevalence found in chickens and environmental contamination rate. Moreover, according to serological results, we reaffirm that free range chickens can be considered as important sentinels this infection, serving as parasite source for cats and intermediate hosts on farms. High titers for *T. gondii* antibodies detected, suggest a significant environmental contamination in properties studied. These results indicate a potential risk to human and animal health.

INDEX TERMS: Toxoplasmosis, indirect fluorescent antibody test, environmental contamination.

RESUMO - *Toxoplasma gondii* é um protozoário apicomplexa que infecta animais de sangue quente, podendo ser considerado um dos principais parasitas capazes de infectar os seres humanos. Galinhas domésticas são facilmente infectadas por protozoários, uma vez que estas podem ingerir oocistos encontrados no solo, sendo consideradas boas indicadoras de contaminação ambiental por *T. gondii*. O objetivo deste estudo foi determinar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em galinhas domésticas criadas extensivamente em zona rural de Santa Maria, RS, Brasil. No período de março de 2013 a fevereiro 2014 foram coletadas 597 amostras de sangue de galinhas domésticas em 74 propriedades, oriundas de nove estratos que representam cada distrito da zona rural. As amostras foram testadas por imunofluorescência indireta, onde 49,2% (294/597) foram positivas para anticorpos anti-*T. gondii*, com títulos variando de 16 a 4096. Das 74 propriedades analisadas, em 63 (85,1%) houve relatos que os gatos têm acesso ao depósito de alimentos, com associação significativa quando associado à presença de galinhas positivas ($p=0,04$) e o OR de 4,07. A variável "abate de animais" (aves e bovinos), em 51 (68,9%) das propriedades foi relatado o abate de bovinos e aves na propriedade, com valor de p significativo ($p=0,05$). A maioria das propriedades 59 (79,7%) foi relatada a presença de gatos domésticos, o que poderia estar associada com a alta soroprevalência encontrada em galinhas e a taxa de contaminação ambiental. De acordo com os resultados obtidos, podemos reafirmar que as galinhas de criação extensiva podem atuar como importantes sentinelas dessa enfermidade, servindo como uma fonte de infecção para

felinos, humanos e outros animais em propriedades rurais. A elevada prevalência de anticorpos encontrada neste estudo, além da alta frequência de propriedades com casos positivos, sugere uma grande contaminação ambiental nos distritos pesquisados, sendo assim um risco potencial para a saúde humana e animal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Toxoplasmose, teste de imunofluorescência indireta, contaminação ambiental, IgY, *Gallus gallus domesticus*

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, zoonótico, capaz de infectar mamíferos e aves (Tenter et al. 2001). Sua infecção é prevalente em várias espécies de aves, podendo causar mortalidade nestes animais (Dubey et al. 2010). Felídeos são os únicos hospedeiros definitivos do *T. gondii*, podendo excretar oocistos no meio ambiente, que servem como fonte de infecção para outros animais (Dubey 2002). Galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) são consideradas importantes hospedeiros intermediários deste protozoário, pois se infectam através da ingestão de oocistos excretados nas fezes de felinos infectados (Ruiz e Frenkel 1980). Assim, estas aves têm grande potencial à exposição aos oocistos, podendo servir como indicadores de contaminação ambiental, atuando também como eficiente fonte de infecção do *T. gondii* para gatos e humanos, que podem se infectar após a ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo as formas infectantes do parasito (Dubey et al. 2002, Dubey 2010).

Em áreas rurais, a distribuição da infecção através dos oocistos pode variar amplamente em decorrência de diversos fatores como a distância entre as casas, o tipo de exploração agropecuária e o cultivo de hortas. As condições ambientais, hábitos culturais e a própria fauna constituem alguns dos fatores que podem explicar a variabilidade desta infecção em diferentes áreas geográficas de um determinado país (Tenter et al. 2000). O impacto da contaminação por oocistos na epidemiologia necessita ser avaliado, pois pode estar diretamente relacionado a altas taxas de infecções em animais e humanos (Tenter et al. 2000, Bahia-Oliveira et al. 2003).

No Brasil, estudos visando a presença de anticorpos em galinhas de vida livre, utilizando teste de aglutinação modificado (MAT) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como técnicas sorológicas, detectaram valores de ocorrência altamente variáveis ao *T.*

gondii (Dubey et al. 2012). Embora este protozoário seja de grande importância e bastante estudado, ainda existem poucos estudos epidemiológicos, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. Diante desta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo determinar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em galinhas domésticas na cidade de Santa Maria, no estado Rio Grande do Sul, Brasil, e também correlacionar os principais fatores de risco em propriedades na zona rural da cidade de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em propriedades da zona rural do município de Santa Maria, na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O município possui uma área rural de 144.054 hectares, dividida em nove localidades, denominados distritos. Para a estimativa da amostragem de propriedades foram utilizados dados oficiais, obtidos na Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Rio Grande Sul (Seapa-RS), determinou-se a partir de uma amostragem estratificada proporcional com 90% de confiança. A amostragem foi realizada de forma aleatória e dividida em nove estratos, representando cada distrito da zona rural de Santa Maria (Fig.1), totalizando 74 propriedades.

As propriedades da amostragem foram visitadas entre março de 2013 a fevereiro 2014. Inicialmente foi aplicado um questionário epidemiológico para avaliar os fatores de risco referentes a hábitos higiênico-alimentares, espécies animais criadas na propriedade e conhecimento sobre a toxoplasmose (Anexo 1). Ao término, foram distribuídos folhetos educativos com medidas de prevenção para a infecção (Apêndice 1).

Em cada propriedade, foram coletadas amostras de sangue de 10 galinhas. aquelas que o total de galinhas era inferior a 10, se coletava todas, o que totalizou 597 galinhas adultas criadas de forma extensiva. O sangue foi coletado por punção da veia ulnar, centrifugado por 10 minutos a 1600 x g, para obtenção do soro, que foi armazenado a 20°C negativos até sua utilização. A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foi realizado através de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, utilizado como antígeno para detecção de imunoglobulina Y (IgY) anti-*T. gondii*. Foi utilizado como anticorpo secundário Anti-chicken IgY^{®1} conjugado com fluoresceína, conforme a técnica realizada por Moré et al. (2008). Amostras sabidamente positivas e negativas, foram utilizadas como controles. Todas as amostras de soro positivas na diluição de 1:16 foram consideradas

¹ anti-chicken IgY[®] conjugada com a fluoresceína (FITC): Affinity Purified Antibody Fluorescein. Sigma, St Louis, MO, USA.

positivas (Garcia et al. 2000) sendo submetidas às demais diluições para determinação do título máximo da reação.

A frequência de propriedades com galinhas soropositivas em cada distrito foi comparada pelo teste de qui-quadrado com 90% de confiança. Para análise dos fatores de risco, as variáveis contidas no questionário investigativo aplicado aos moradores foram analisadas através do programa Epiinfo 6.0. Com o objetivo de pesquisar a associação entre as diversas variáveis, foi calculada a força das associações mediante o cálculo do (OR) *odds ratio* e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, pode-se estabelecer um percentual de propriedades com galinhas soropositivas no município de Santa Maria – RS e a seguir, puderam ser realizadas todas as demais comparações com os parâmetros epidemiológicos analisados. Os resultados obtidos estão apresentados no Tabela 2 e Figura.2.

Das 597 amostras de soro de galinhas analisadas, 294 (49,2%) foram positivas para anticorpos anti-*T. gondii*. Em relação às propriedades analisadas, pode-se verificar que a maioria destas (94,6%) apresentava pelo menos uma galinha positiva. Em quatro (5,4%) propriedades avaliadas, não foram encontrados animais anticorpo positivo.

Trabalhos realizados no Brasil demonstram diferentes percentuais de galinhas domésticas positivas ao *T. gondii*. Alguns relatam uma taxa de detecção de anticorpos superior à encontrada no presente estudo (49,2%), como em Rondônia, com 66% (Dubey et al. 2006) e em Fernando de Noronha, com 84% de animais positivos (Dubey et al. 2010). Outros trabalhos relatam frequências semelhantes, no Nordeste de 53,3% (De Oliveira et al. 2009), Minas Gerais com 53,6% (Brandão et al. 2006) e também índices inferiores, como de 38,8% no Espírito Santo (Beltrame et al. 2012), 27,6% no Rio de Janeiro (Casartelli-Alves et al. 2012) e de 10,3% no estado do Paraná (Garcia et al. 2000). No Rio Grande do Sul, a pesquisa mais recente foi realizada na região sul, com uma ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em 38% das galinhas pesquisadas (Dubey et al. 2007). Estes dados demonstram a ampla distribuição deste protozoário. Ressalta-se que, conforme observado por Casartelli-Alves et al. (2012), a maioria destes trabalhos são de detecção de anticorpos e não da estimativa de prevalência e fatores de risco. Muitos destes estudos foram desenvolvidos com intuito de determinar a diversidade genética do *T. gondii*, não se preocupando com cálculo amostral e sorteio aleatório das propriedades. Desta forma, o planejamento amostral do

presente estudo, torna os resultados sorológicos obtidos (49,2%) de grande importância epidemiológica e de alta confiabilidade, considerando a representatividade da amostragem.

As amostras de soro positivas foram submetidas à titulação, com títulos de anticorpos variando de 16 a 4096, usando base 2 (Tabela 2). A maioria das amostras apresentou título de 16 (19%) e 64 (20,7%). Fatores que podem influenciar o título de anticorpos anti-*T. gondii* estão relacionados com características de patogenicidade e virulência do agente ou da dose infectante (Larsson, 1989). Nos títulos de anticorpos obtidos em cada distrito, os maiores títulos (2048 e 4096) foram observados em três distritos - Arroio Grande, Pains e Santa Flora, podendo assim, sugerir uma infecção aguda ou reinfecção por *T. gondii* (Wastling et al. 1995; Dzitko et al. 2006).

Entre as 74 propriedades pesquisadas, 66 (91,9%) são consideradas pequenas ou de agricultura familiar, quando analisado pelo fator terra de acordo com o artigo 3, da LEI Nº 11.326, DE 24 DE JULHO DE 2006 (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2004-2006/2006/lei/111326), o tamanho da propriedade não foi significativo quando associado com a presença de galinhas soropositivas. Embora não tenha relevância estatística, é importante ressaltar que as quatro propriedades negativas, em que não foram encontradas galinhas anticorpo positivas para *T. gondii*, eram pequenas, com máximo 10 hectares, com menor criação de espécies animais e menor relato de abate doméstico de animais.

Na figura 2 está apresentada a avaliação da frequência de propriedades com galinhas soropositivas nos nove distritos analisados. Apenas um distrito (Arroio do Só), demonstrou menor contaminação ($p=0,051$) que os demais. No entanto, a análise dos resultados indica que esta menor taxa de contaminação pode refletir a realidade deste distrito, uma vez que em 40% das propriedades deste local não foram detectadas galinhas soropositivas.

Galinhas podem ser utilizadas como indicadoras da contaminação por oocistos de *T. gondii* no ambiente, uma vez que a detecção direta dos mesmos no solo é considerada de difícil diagnóstico e impraticável (Dubey 2010). Assim, a estimativa da taxa de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* é uma importante ferramenta epidemiológica. Os dados obtidos neste estudo (Figura. 2) demonstram um alto percentual de contaminação ambiental por distrito, podendo oferecer riscos tanto a saúde humana quanto animal.

Através da análise univariada dos fatores de risco à infecção por *T. gondii* nas 74 propriedades avaliadas, foi determinada a importância dos fatores de risco estimados pelo questionário epidemiológico (Tabela 1). Das 74 propriedades analisadas, em 63 (85,1%) há relatos que os gatos têm acesso ao depósito de alimentos, com associação significativa quando associado à presença de galinhas positivas ($p=0,04$) e o OR de 4,07. A variável “abate de

animais” (aves e bovinos), em 51 (68,9%) das propriedades foi relatado o abate de bovinos e aves na propriedade, com valor de p significativo ($p=0,05$). Destes dados é importante ressaltar a associação significativa de ($p<0,05$) encontrada, porém quando avaliado o intervalo de confiança, o mesmo não foi significativo. Estudos já relataram que a presença de gatos é o principal fator de risco para *T. gondii*, já que animais podem se infectar ao ingerirem alimentos e água contaminados com oocistos liberados nas fezes de felinos infectados (Luzon et al. 1997). No entanto, a análise realizada na amostra em estudo não evidenciou associação de riscos significativos, o que corrobora com diferentes trabalhos que demonstraram que o acesso de gatos em depósitos não foi associado à infecção pelo *T. gondii* como Valença et al. (2011) em granjas de suínos e Pereira et al. (2012) em propriedades de ovinos e caprinos. Conforme Cademartori et al. (2008), a maioria dos estudos epidemiológicos já realizados não são uniformes quanto à associação entre a infecção por *T. gondii* e o convívio com gatos, relatando que também não foi constatada essa associação em trabalho realizado com gestantes em Pelotas, RS. O que não deixa de ser uma preocupação com a contaminação de alimentos de pessoas e animais.

No presente estudo, na maioria das propriedades 59 (79,7%) foi relatada a presença de gatos domésticos, o que poderia estar associada com a alta soroprevalência encontrada em galinhas e a taxa de contaminação ambiental. Das 15 (20,3%) propriedades que relataram não ter gatos, apenas em duas não foram encontradas galinhas anticorpo positivas para *T. gondii*. Isto pode ser explicado pela sobrevivência dos oocistos no solo, que pode ser de até 18 meses (Dubey 1998) ou pelo hábito que os gatos têm de percorrer quilômetros para caçar ou até mesmo em busca de fêmeas no cio, facilitando a disseminação de oocistos nas propriedades. Há propriedades, que segundo relato, gatos são criados com a finalidade de combater os roedores que buscam alimentos nos depósitos, o que também poderia estar relacionado com a contaminação destes ambientes.

Trabalhos afirmam que animais de produção podem representar um verdadeiro risco para a transmissão da toxoplasmose, seja direta ou indiretamente (Samra et al. 2007, Cenci Goga 2009). Carnes de suínos, ovinos e caprinos abrigam um grande número de cistos teciduais e que a carne de bovinos e búfalos raramente contém cistos, no entanto, em algumas regiões, mais de 90% de bovinos são soropositivos para *T. gondii* (Dubey e Jones 2008). A maioria das propriedades 66 (89,1%) abate pelo menos uma espécie animal para consumo próprio, sendo que 51 destas apresentaram galinhas positivas. Ou seja, segundo teste Exato de Fischer (com 95% de confiança ($p=0,027$)), propriedades com maior contaminação abatem mais animais que as não contaminadas. Embora as variáveis de abate não tenham apresentado

associação significativa ao *T. gondii* neste estudo, não se descarta a importância desta atividade, principalmente por que os felinos acabam tendo acesso às carcaças e vísceras destes animais, aumentando a possibilidade de infecção pelo parasita.

A utilização de água de vertentes ou mina para abastecimento animal apresentou influência significativa quando associado a galinhas soropositivas ($p < 0,05$), o OR de 0,15, mas um intervalo de confiança não significativo. Este dado é importante devido à longa sobrevivência dos oocistos de *T. gondii* no ambiente. E na água a contaminação com oocistos de *T. gondii*, pode ser considerada tão importante quanto a contaminação de alimentos como fonte de infecção (Cenci Goga et al. 2013). Casos como o de Santa Isabel do Ivaí, em que ocorreu um surto de toxoplasmose em 2001, em virtude da contaminação de um reservatório de água da cidade por oocistos, demonstram o alto risco do acesso de gatos nestes locais (Dubey et al. 2004). Diante desta variedade de fatores relacionados, a compreensão das principais vias de transmissão horizontal é de extrema importância, tornando-se um desafio para o desenvolvimento de práticas sanitárias eficientes para a prevenção da toxoplasmose em humanos e animais.

A partir dos resultados observados neste estudo podemos reafirmar a importância das galinhas domésticas como hospedeiros intermediários de *T. gondii*, visto a grande prevalência encontrada. Estas aves podem servir como uma fonte de infecção para felídeos e outros hospedeiros intermediários nas diferentes propriedades rurais pesquisadas, podendo ser consideradas um importante fator de risco para toxoplasmose. Com relação à contaminação ambiental por *T. gondii* podemos inferir que os oocistos encontram-se amplamente distribuídos na zona rural de Santa Maria. Diante disso, ressalta-se a necessidade de implantação de programas educativos com medidas de prevenção e controle da toxoplasmose, gerando conhecimento para a população com relação aos fatores de risco a doença.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso animal protocolo (CEUA-UFSM 049 / 2012).

REFERÊNCIAS

Biancifiori, F., Rondini C., Grelloni V. & Frescura T. 1986. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chickens and pigeon. Comp. Immun., Micro. & Infec. Diseases, 9:337-346.

- Beltrame, M.A.V., Pena H.F.J., Ton N.C., Lino A.J.B., Gennari S.M., Dubey J.P. & Pereira F.E.L. 2013. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 188:225-230.
- Brandão, G.P. Ferreira A.M., Melo M.N. & Vitor R.W.A. 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite*, 13:143-149.
- Casartelli-Alves, L.C., Ferreira L.C., Vicente R.T., Millar P.R., Oliveira R.V.C., Amendoeira M.R.R., Schubach T.M.P. & Menezes R.C. 2012. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas criadas extensivamente em Rio Bonito, Rio de Janeiro. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.*, 64:1398-1401.
- De Oliveira, L.N., Costa Junior L.M., De Melo C.F., Ramos Silva J.C., Bevilaqua C.M.L., Azevedo S.S., Muradian V., Araújo D.A.F.V., Dubey J.P. & Gennari S.M. 2009. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast region of Brazil. *J. of Parasit.*, 95:235-237.
- Dubey J.P. & Beattie C.P. 1988. *Toxoplasmosis of animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 43p.
- Dubey, J.P. 1993. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier, J.P. *Parasitic protozoa*. New York: Academic Press, 6:150-158.
- Dubey J.P. 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J Parasitol.*, 84(4):862–865.
- Dubey J.P., Graham D.H., Dahl E., Sreekumar C., Lehmann T., Davis M.F. & Morishita T.Y. 2003. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from United States. *The J. of Parasitol.*, 89(5):1060-1062.
- Dubey, J.P. 2002. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet. Parasitol.*, 106:121-153.
- Dubey, J.P., Gennari S.M., Labruna M. B., Camargo L.M.A., Vianna M.C.B., Marcet P.L. & Lehmann T. 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. *The J. of Parasitol.*, 92:36-40.
- Dubey, J.P., Sundar N., Gennari S.M., Minervino A.H.H., Farias N.A. da, Ruas J.L., Santos T.R.B. dos, Cavalcante G.T., Kwok O.C.H. & Su C. 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.*, 143:182-188.

- Dubey, J.P. 2009. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses and Public Health*, 57:60-73.
- Dubey, J.P., Rajendran C., Costa D.G.C., Ferreira L.R., Kwok O.C.H., Qu D., Su C., Marvulo M.F.V., Alves L.C., Mota R.A., & Silva J.C.R. 2010. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *The J. of Parasitol.*, 96:709-712.
- Dubey, J.P., Lago E.G., Gennari S.M., Su C. & Jones J.L. 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitol.*, 139(11):1375-1424.
- Dzitko, K., Staczek P., Gatkowska J. & Dlugonska H. 2006. *Toxoplasma gondii*: Serological recognition of reinfection. *Experimental Parasitol.*, 112:134-137.
- Garcia, J.L., Navarro I.T., Ogawa L. & Marana E.R.M. 2000. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, 30:123-127.
- Larsson, C.D. 1989. Diagnóstico laboratorial da Toxoplasmose: reações utilizadas e interpretação clínica. *Cães e Gatos*, jan/fev, 5-11.
- Moré, G., Basso W., Bacigalupe D., Venturini M.C. & Venturini L. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol. Research*, 102:671–675.
- Ruiz, A. & Frenkel, J.K., 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *The American Society Tropical of Med. Hygien*, 29:1161-1166.
- Wastling, J. M. Harkins D., Maley S., Innes E., Panton W., Thomson K. & Buxton D. 1995. Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. *J of Comparative Pathol*, 112:53-62.

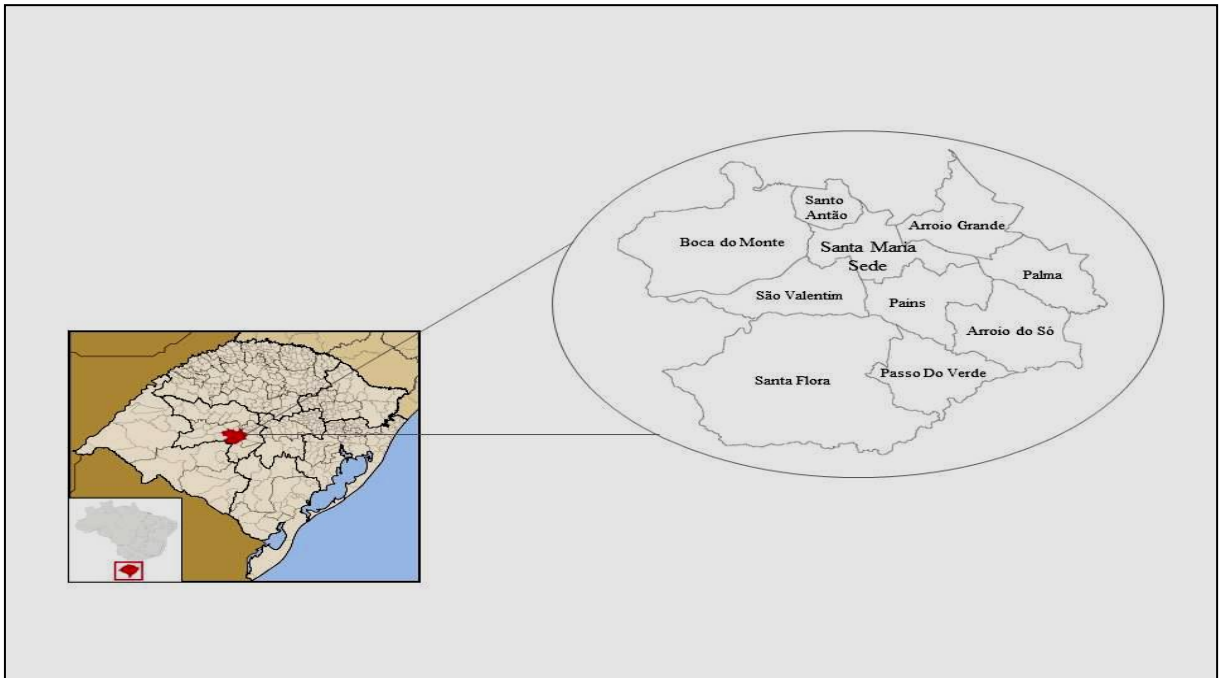


Figura 1. Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com a localização do município de Santa Maria. Em destaque o mapa de Santa Maria, localizada no centro do estado, composto por nove distritos que compreendem a zona rural e caracterizam os estratos.

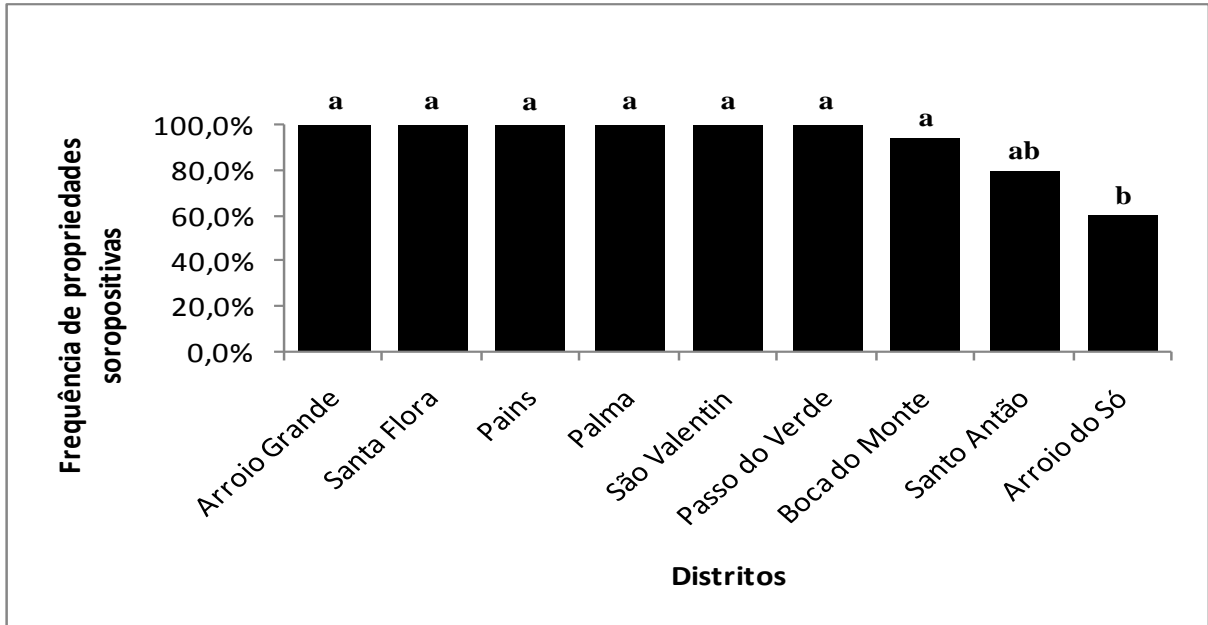


Figura 2. Frequência de contaminação das propriedades nos nove distritos pesquisados. Letras distintas representam diferença estatística com 90% de confiança pelo teste de qui-quadrado.

Tabela 1. Análise univariada para os fatores de risco associados ou não à contaminação por *T. gondii* em galinhas naturalmente infectadas em propriedades da zona rural do município de Santa Maria, RS.

Variáveis		N Propriedades (%)	Análise Univariada			Valor de p
			OR	(I.C.95%)	X ²	
Atividade	Lazer/agricultura	12 (16,4)	0,17	0,03-1,26	3,47	0,06
	Pecuária/ mista	61 (83,6)				
Tamanho da propriedade	Pequena	68 (91,9)	-	-	0,11	0,75
	Grande	6 (8,1)				
Presença de equinos	Não	41 (55,4)	2,53	0,21- 67,48	0,69	0,42
	Sim	33 (44,6)				
Presença de suínos	Não	30 (40,5)	0,49	0,05-4,48	0,02	0,90
	Sim	44 (59,5)				
Presença de bovinos	Não	15 (20,3)	1,33	0,15-11,73	0,06	0,81
	Sim	59 (79,7)				
Presença de ovinos	Não	52 (70,3)	1,27	0,14-11,54	0,04	0,83
	Sim	22 (29,7)				
Presença de cães	Não	2 (2,7)	0,00	-	0,12	0,73
	Sim	72 (97,3)				
Presença de gatos	Não	15(20,3)	3,93	0,60-25,68	2,28	0,131
	Sim	59(79,7)				
Acesso de gatos no depósito	Não	11 (14,9)	4,07	0,90-36,51	4,07	0,04
	Sim	63 (85,1)				
Acesso de gatos na pastagem	Não	52 (70,2)	1,27	0,14-11,54	0,04	0,83
	Sim	22 (29,7)				
Acesso de gatos na horta	Não	30 (40,5)	4,4	(0,48-40,32)	0,85	0,36
	Sim	44 (59,5)				
Humanos.- artesiano	Não	38 (51,4)	0,95	0,14-6,37	0,21	0,65
	Sim	36(48,6)				
Humanos.- vertentes	Não	52 (70,3)	0,42	0,06-2,82	0,82	0,37
	Sim	22(29,7)				
Humanos - Poço conv.	Não	61 (82,4)	-	-	0,89	0,34
	Sim	13 (17,6)				
Humanos - via pública	Não	69 (93,2)	-	-	0,30	0,58
	Sim	5 (6,8)				
Animais - artesiano	Não	59 (79,7)	-	-	1,06	0,31
	Sim	15 (20,3)				
Animais - vertente	Não	51 (68,9)	0,15	0,02-1,37	3,76	0,05
	Sim	23 (31,1)				
Animais - poço conv.	Não	63 (85,1)	-	-	0,73	0,39
	Sim	11 (14,9)				
Animais - açúde	Não	33 (44,6)	1,24	0,18-8,35	0,05	0,82
	Sim	41 (55,4)				
Animais - via pública	Não	70 (94,6)	-	-	0,24	0,62
	Sim	4 (5,4)				
Abate de aves	Não	23 (31,1)	6,65	0,73-60,78	3,76	0,05
	Sim	51(68,9)				
Abate de ovinos	Não	56 (82,4)	-	-	1,34	0,25
	Sim	18 (17,6)				

Abate de bovinos	Não	23 (31,1)	6,65	0,73-60,58	3,76	0,05
	Sim	51 (68,9)				
Abate de suínos	Não	31 (41,9)	1,39	0,21-9,32	0,11	0,74
	Sim	43 (58,1)				
Consumo de carne cozida	Não	2 (2,7)	0,0	-	0,12	0,73
	Sim	72 (97,3)				
Consumo de carne mal passada	Não	71 (95,9)	-	-	0,18	0,67
	Sim	3 (4,1)				
Consumo de embutidos	Não	18 (24,3)	1,04	0,11-9,36	0,32	0,58
	Sim	56 (75,7)				
Histórico de toxoplasmose	Não	66 (89,2)	0,36	0,04-3,09	0,01	0,92
	Sim	8 (10,8)				
Diagnóstico	Não	57 (77)	0,89	0,10-8,05	0,26	0,61
	Sim	17 (23)				
Gestantes	Não	69 (93,2)	-	-	0,22	0,64
	Sim	5 (6,8)				

OR = "Odds ratio"; IC = Intervalo de confiança de 95%

*Abastecimento de água

Tabela 2. Frequência de anticorpos anti-*T. gondii* detectados através da reação de imunofluorescência indireta em galinhas domésticas de nove distritos, da zona rural de Santa Maria, RS.

Distrito (n° de propriedades)	Título de anticorpos									Galinhas positivas/ total (%)
	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	
Boca do Monte (17)	15	9	15	6	8	2	0	0	0	55/127 (43,3)
Arroio Grande (12)	11	7	6	6	4	4	1	4	1	44/102 (43,1)
Santa Flora (11)	11	6	12	1	10	5	0	5	5	55/97 (56,7)
Pains (9)	14	9	2	2	0	3	2	9	3	44/72 (61,1)
Palma (6)	3	1	5	3	0	3	3	2	0	20/60 (33,3)
Arroio do Só (5)	1	2	2	3	1	0	0	0	0	9/27 (33,3)
São Valentim (5)	0	1	7	10	6	1	0	0	0	25/38 (65,7)
Santo Antônio (5)	0	4	2	3	1	1	1	0	0	12/38 (31,5)
Passo do Verde (4)	1	1	10	9	6	3	0	0	0	30/36 (83,3)
Total	56	40	61	43	36	22	7	20	9	294/597 (49,5)

5 CAPÍTULO III – Artigo científico.

Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) da zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil¹

Giovana Camillo^{2*}, Marta E. A. Machado², Gustavo C. Cadore², Patrícia Bräunig²,
 Maria C. Venturini³, Lais L. Pardini³, Luiz Daniel de Barros⁴, Luis A. Sangioni²,
 Fernanda S.F. Vogel²

ABSTRACT. - Camillo, G., Alves, M. E. M., Cadore, G. C., Bräunig, P., Pardini, L., Venturini, M. C., Barros, L.D., Sangioni, L. A., Vogel, F. S. F. [Genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-Range chickens naturally Infected in rural area of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00, 2XXX. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: giovanacamillo@yahoo.com.br

Free range chickens fed oocysts of *T. gondii* may harbor virulent strains of the parasite in different tissues without any clinical signs of toxoplasmosis. The isolation of *T. gondii* by bioassay in mice and cats from tissues of naturally infected chickens, has been described in several countries, which demonstrates the then importance of free range chickens in the transmission of the parasite. Thus, the aim of this study was to characterize genotypically isolates of *T. gondii* obtained from naturally infected free range chickens in rural Santa Maria, RS. To attempt to parasite isolation, brain and heart samples of 12 positive chickens (titers \geq 64) for *T. gondii* were processed by peptic digestion technique. The suspension obtained from the brain and heart of each chicken was inoculated intraperitoneally into mice. The *T. gondii* DNA extraction was performed from samples of tissues and tachyzoites recovered in the peritoneal fluid of mice. Genotypic characterization of isolates was performed using 12 genetic markers: SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358,

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. *Autor para correspondência: giovanacamillo@yahoo.com.br

³ Laboratorio de Immunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296 (1900), La Plata, Argentina.

⁴ Doutorando em Ciência Animal Laboratório de Protozoologia, Universidade Estadual de Londrina/ Centro de Ciências Agrárias/Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/ Campus Universitário- Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Cx. Postal 6001, Londrina, PR. 86051-990.

PK1, apical. RH, ME49 and VEG strains was used as a standard genotype I, II, and III, respectively. The DNA target sequences were first amplified by multiplex PCR, using primers external to all markers, followed by nested-PCR using internal primer for each marker individually. Then, the nested-PCR products were cleaved by restriction enzymes with specific conditions of temperature and time for each marker. From the bioassay was obtained nine isolates. The result of the analysis of genotypic strains of *Gallus gallus domesticus* present study revealed the presence of five genotypes according to ToxoDB (# 11, # 55, # 64, # 140 and # 163) plus two new ones, not described above. From the results it could be observed there is a wide genetic diversity of *T. gondii* in the study region.

INDEX TERMS: Toxoplasmosis, Chickens, Genotypes, PCR-RFLP Diversity

RESUMO. - Galinhas alimentadas com oocistos de *T. gondii* podem albergar cepas virulentas do parasito em diferentes tecidos sem apresentar sinais clínicos de toxoplasmose. O isolamento de *T. gondii* por bioensaio em camundongos e gatos a partir de tecidos de galinhas naturalmente infectadas, tem sido descrito em diversos países, o que denota a importância das galinhas na transmissão do parasito. Assim, o principal objetivo deste estudo foi caracterizar genotipicamente isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas naturalmente infectadas na zona rural de Santa Maria, RS. Para tentativa de isolamento do parasito, amostras de cérebro e coração de 12 galinhas positivas (títulos ≥ 64) para *T. gondii* foram processadas através da técnica de digestão péptica. A suspensão obtida a partir do cérebro e coração de cada galinha foi inoculada via intraperitoneal em camundongos. A extração de DNA de *T. gondii* foi realizada a partir de amostras dos tecidos e dos taquizoítos recuperados no líquido peritoneal dos camundongos. A caracterização genotípica dos isolados foi realizada utilizando os 12 marcadores genéticos, SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico. As cepas RH, ME49 e VEG foram utilizadas como padrão genotípico I, II, e III, respectivamente. As sequencias alvo do DNA foram primeiramente amplificadas pela PCR-multiplex, utilizando *primers* externos de todos os marcadores, seguida de uma PCR-nested, utilizando *primers* internos individualmente para cada marcador. Em seguida, os produtos da PCR-nested foram clivados por meio de enzimas de restrição e condições de temperatura e tempo específicos para cada marcador. A partir do bioensaio, obteve-se nove isolados. O resultado da análise genotípica dos isolados de *Gallus gallus domesticus* do presente estudo revelou a presença de cinco genótipos de acordo com o ToxoDB (#11, #55, #64, #140 e #163), além de dois outros novos, não descritos anteriormente. A partir dos

resultados obtidos pode-se observar que há uma ampla diversidade genética do *T. gondii* na região de estudo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Toxoplasmose, Galinhas, Genótipos, RFLP, Diversidade

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, que é considerada uma das mais importantes doenças zoonóticas, é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que está mundialmente distribuído e é capaz de infectar muitas espécies de aves e mamíferos (Dubey 2010). Galinhas infectadas com oocistos de *T. gondii* podem albergar cepas virulentas deste parasito em diferentes tecidos sem apresentar sinais clínicos (Dubey 2002). Uma vez infectadas, estas aves podem servir de fonte de infecção para gatos que se tornam hospedeiros definitivos e resulta na excreção de oocistos no ambiente (Ruiz e Frenkel 1980).

Para melhor compreensão da epidemiologia deste protozoário, o isolamento de *T. gondii* por bioensaio em camundongos e gatos a partir de tecidos de galinhas naturalmente infectadas, tem sido descrito em vários países (Dubey, 2010). No Brasil, o isolamento do *T. gondii* já foi descrito em diferentes regiões, incluindo Amazônia (Dubey et al., 2006b), Rio de Janeiro (Dubey et al., 2003a), Paraná (Dubey et al., 2003d), São Paulo (Dubey et al., 2002b), Pará, Rio Grande do Sul (Dubey et al., 2007), Minas Gerais (Brandao et al., 2006), Pernambuco, Rio Grande do Norte, Maranhão, Bahia, Ceará, Sergipe e Alagoas (de Oliveira et al., 2009), Fernando de Noronha (Dubey et al., 2010), Pantanal (Soares et al., 2011) e Espírito Santo (Pena et al., 2013).

Os primeiros estudos moleculares mostraram que o *T. gondii* apresentava uma estrutura populacional altamente clonal, e consistiria em de três linhagens clonais predominantes, designadas como tipo I, II e III, ocorrendo de forma global nos animais e no homem (Dardé et al., 1992; Howe e Sibley, 1995). Recentemente, a partir de estudos de polimorfismos foi demonstrado que isolados de *T. gondii* de animais do Brasil possuem uma alta diversidade genética (Ferreira et al. 2001, 2006; Pena et al. 2008). No Rio Grande do Sul, estudo com isolados de *T. gondii*, a partir de tecidos de galinhas foram observados sete genótipos, sendo cinco com combinações diferentes dos alelos I, II e III (Dubey et al., 2007). Com isso, na busca de novas informações sobre a distribuição de genótipos de *T. gondii* e da diversidade do mesmo no Brasil, o principal objetivo deste estudo foi caracterizar genotipicamente isolados de *T. gondii* de galinhas naturalmente infectadas em área rural do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para realização deste estudo foram utilizadas 12 galinhas de vida livre, adultas, provenientes de diferentes propriedades da zona rural do município de Santa Maria, na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os soros obtidos foram utilizados para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por meio da técnica de Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), conforme descrito anteriormente por Camargo et al, (1974).

Bioensaio em camundongos

Para tentativa de isolamento do parasita, amostras de cérebro e coração de 12 galinhas positivas (títulos ≥ 64) foram obtidas após eutanásia. Um *pool* dos tecidos de cada galinha foi processado através da técnica de digestão péptica (Dubey, 1998). A suspensão obtida foi inoculada, via intraperitoneal, em quatro camundongos *Swiss* (1ml/animal). Os camundongos inoculados foram observados diariamente, e os que apresentavam sinais clínicos da doença (pelos eriçados, lacrimejamento, emagrecimento, diarreia e distensão abdominal) foram submetidos à eutanásia para a colheita do líquido peritoneal e a verificação da presença de taquizoítos. Após 60 dias de inoculação, nos camundongos restantes, que não apresentaram sinais clínicos evidentes, foi realizado a eutanásia para colheita de sangue e cérebro. O cérebro foi utilizado para a pesquisa de cisto tecidual por meio do *in print* entre lâmina e lamínula. O soro obtido foi armazenado a -20°C até a realização da reação de imunofluorescência indireta para a pesquisa de IgG anti-*T. gondii*.

Extração de DNA

A extração de DNA de *T. gondii* foi realizada a partir dos taquizoítos recuperados no líquido peritoneal dos camundongos com infecção aguda e de amostras de cérebro daqueles camundongos que foram eutanasiados com 60 dias. Para isso foi utilizado o *kit wizard genomics DNA purification* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Genotipagem

A determinação dos genótipos de *T. gondii* presentes nas amostras foi realizada utilizando os 11 marcadores genéticos, SAG1, 5'3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico, conforme previamente descrito (Su et al., 2006, Su et al., 2010). As sequências alvo do DNA foram primeiramente amplificadas pela PCR-multiplex,

utilizando *primers* externos de todos os marcadores, seguida de uma PCR-*nested*, utilizando *primers* internos individualmente para cada marcador. Amostras de DNA das cepas padrão RH, ME49 e VEG foram utilizadas como controle para os genótipos I, II, e III, respectivamente.

Os produtos da PCR-*nested* foram então clivados por meio de enzimas de restrição em determinadas condições de temperatura e tempo (Tabela 1) específicos para cada marcador, o que corresponde a técnica de RFLP, conforme Su et al., 2010. Para cada reação, 3µL do produto da PCR-*nested* foi adicionado com 17µL de reação de digestão, contendo Tampão 10x, 0,1mg/mL de BSA e uma unidade de cada enzima. Após digestão enzimática todos os produtos foram visualizados sobre luz UV, sendo que estes foram previamente submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,5 ou 3%, dependendo do marcador, corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) e fotoregistrados. Para analisar as fotos obtidas após RFLP, também foram utilizados como referência outros 8 controles: GT1, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64 e TgRsCr1. Os resultados obtidos foram comparados e classificados de acordo com os genótipos presentes no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). A história evolutiva foi inferida utilizando uma árvore filogenética utilizando o método neighbor-joining por meio da utilização do programa SplitsTree 4.0.

RESULTADOS

A partir do bioensaio destes animais foram obtidos nove isolados (Tabela 2). Os camundongos inoculados com material das galinhas SF306, SF1, P1 e P2 apresentaram sinais agudos da infecção entre 10 e 15 dias pós-inoculação e taquizoítos de *T. gondii* foram obtidos no lavado intraperitoneal. Cistos de *T. gondii* foram observados no cérebro de camundongos inoculados com material das galinhas (SF439, SA, BM, AG e AS) sugestivos de infecção crônica. Camundongos inoculados com material das galinhas PA, SV e PV não apresentaram sinais e foram negativos para RIFI. Um camundongo inoculado com material da galinha BM demonstrou sinais neurológicos (inclinação da cabeça para o lado, andar em círculos e incoordenação motora) e diversos cistos cerebrais foram observados na microscopia.

O resultado da análise genotípica dos nove isolados do presente trabalho revelou a presença de sete genótipos (Tabela 3). Cada genótipo foi comparado aos já existentes no banco de dados de genotipagem (ToxoDB.org). Os resultados genotípicos obtidos através da caracterização molecular dos nove isolados do presente estudo serão depositados neste banco para futuros estudos.

Cinco genótipos encontrados correspondem aos genótipos ToxoDB #11, #55, #64, #140 e #163 e os outros dois ainda não foram descritos anteriormente e estes serão depositados no ToxoDB para futuros estudos. Em relação ao isolado SA, não foi possível determinar o genótipo das amostras, pois não foi observada amplificação em todos os marcadores moleculares. Sete genótipos contêm diferentes combinações de alelos I, II e III. O genótipo #11 foi caracterizado nos isolados de galinhas de duas diferentes propriedades (P1 e P2), no distrito de Pains. Já os isolados SF306, SF1 e SF439 foram caracterizados, respectivamente como genótipos #55, #64 e #140, sendo que as três galinhas eram de origem de propriedades do mesmo distrito, de Santa Flora. O genótipo #163 foi encontrado no isolado de uma galinha do distrito de Boca do Monte. Os novos genótipos foram observados em isolados de galinhas das propriedades de dois diferentes distritos, Arroio do Só e Arroio Grande.

A partir da análise da árvore filogenética (Figura 1) observa-se que os isolados encontrados no presente estudo são geneticamente mais próximos das cepas GT1 (Tipo I) ou CTG (Tipo III) se comparado com PTG (Tipo II).

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que o protozoário *T. gondii* pode ser encontrado nas diferentes propriedades pesquisadas, circular em hospedeiros assintomáticos e ainda apresentar característica de virulência em camundongos, assim como já descrito por Dubey et al., (2002). Quatro dos nove isolados (SF1, SF306, P1 e P2) apresentaram características virulentas quando inoculados em camundongos, ocasionando a morte dos animais em um intervalo de 12 a 15 dias. Em relação aos demais cinco isolados (SF439, SA, BM, AS, AG), os camundongos não apresentaram sinais de infecção aguda e após 60 dias foram eutanasiados. Nestes animais, foi observada a presença de cistos do protozoário no cérebro, caracterizando a infecção crônica.

Conforme Dubey et al. (2004), a virulência *T. gondii* pode variar quanto à cepa, ao estágio que se encontra o parasita, bem como da dose que foi inoculada, o que pode ser notado com as diferentes características fenotípicas observadas no presente estudo. Estudos têm demonstrado que isolados de *T. gondii* de galinhas assintomáticas do Brasil são mais patogênicos para camundongos que isolados da Europa e América do Norte, independente dos genótipos (Dubey et al., 2006).

A análise genotípica dos isolados de galinhas do presente trabalho revelou a presença de cinco genótipos, de acordo com o ToxoDB (#11, #55, #64, #140 e #163), além de dois outros novos, não descritos anteriormente. Todos os genótipos encontrados contêm diferentes combinações dos alelos I, II e III. Similarmente a outros estudos já realizados no Brasil, a estrutura populacional de *T. gondii* encontrada neste estudo é muito mais diversa que na América do Norte e Europa, onde geralmente são encontrados definidos tipos clonais I, II e III (Dubey et al. 2008).

Vários marcadores já foram utilizados para analisar cepas brasileiras e estruturas filogenéticas altamente diferenciadas foram identificadas, sugerindo que a recombinação como importante fator para diversidade das cepas na América do Sul (Pena et al., 2008). No Brasil, o genótipo #11 encontrado em dois isolados deste estudo já foi isolado de gatos nos estados do Paraná e São Paulo (Dubey et al., 2004, Pena et al., 2006; Dubey, et al. 2008) e de galinhas no Rio de Janeiro e Paraná (Dubey et al., 2003a,b). Este mesmo genótipo também já foi isolado em uma galinha na Argentina (TgCkAr1) (Rajendran et al., 2012). No presente estudo, os dois isolados com o genótipo #11 (P1 e P2) eram de galinhas de propriedades diferentes, porém pertenciam à mesma localidade (distante aproximadamente 20 km) e fenotipicamente apresentaram similaridade de sinais quando observados os camundongos. Já o genótipo #55, característico do isolado SF306 deste estudo já foi observado em gatos do estado de São Paulo (TgCatBr79,80), por Pena et al., (2008), que demonstraram que os camundongos inoculados morreram entre 14 e 27 dias. No presente estudo, observou-se que os camundongos inoculados com este isolado começaram a apresentar sinais da doença a partir do dia sete, o que se pode sugerir que o isolado é altamente patogênico para camundongos. O genótipo #64 também foi descrito anteriormente em galinhas de São Paulo, isolados TgCkBr19 e TgCkBr24 (Dubey et al., 2008) e o genótipo #140 foi caracterizado em isolado (TgCkNi27) de galinha da Nicarágua (Rajendran et al., 2012.). Estes três últimos genótipos descritos neste estudo (#55, #64 e #140) foram isolados de galinhas de diferentes propriedades, porém da mesma localidade, o que sugere uma diversidade dos mesmos em locais próximos (10 Km de distância). Também foram observadas diferenças fenotípicas entre os mesmos, sendo que apenas o isolado de genótipo #140 apresentou cistos no cérebro característica de infecção crônica. Já o genótipo #163 encontrado no presente estudo foi isolado de uma galinha do distrito de Boca do Monte (BM), sendo que os camundongos só apresentaram sinais (inclinação da cabeça para o lado, andar em círculos e incoordenação motora) após 40 dias de inoculação. Este mesmo genótipo já foi descrito em um trabalho na Ilha de Fernando de Noronha, Brasil, também isolado de galinha (TgCkBr220) e os autores

observaram que todos isolados encontrados não foram patogênicos para camundongos (Dubey et al., 2010).

Em estudo realizado com galinhas naturalmente infectadas no Sul do Rio Grande do Sul, Dubey et al., (2007) encontraram 19 isolados (TgCkBr 146-164) e sugerem que linhagens do tipo I e III ou seus correspondentes circulam no estado. No estudo foi observado que apenas o isolado TgCkBr146 teve alelo tipo I para todos 11 marcadores pesquisados e nos isolados TgCkBr158, 161 e 164 foi caracterizado alelo tipo III. Os demais isolados tiveram diferentes combinações de alelos e quando comparados com o presente estudo, observou-se diversidade de genótipos dentro de áreas geográficas próximas. Esta diversidade encontrada em espaços tão próximos pode ser explicada pela alta taxa de infecção mista em hospedeiros intermediários, tais como galinhas, que podem facilitar o intercâmbio genético entre as diferentes linhagens do parasita em hospedeiros definitivos (Dubey et al., 2006). O sucesso das linhagens clonais pode ter resultado da aquisição simultânea por infecção oral. Esta adaptação contornada pela recombinação sexual promove simultaneamente, transmissão através de sucessivos hospedeiros, levando a expansão clonal (Su et al., 2003)

Em estudos realizados no mundo todo utilizando a PCR-RFLP destaca-se a importância da genotipagem de isolados de *T. gondii*, através da qual foi possível gerar informações relevantes quanto à diversidade do parasita. A partir desses estudos, torna-se mais fácil estudar as diferenças biológicas entre os diferentes genótipos de *T. gondii* e investigar se os genótipos estão relacionados com as manifestações da doença na toxoplasmose humana (Saeij et al., 2005, Pena et al., 2008). Dessa forma, conforme Pena et al. (2008), estudos epidemiológicos capazes de revelar a diversidade da população de *T. gondii* no ambiente, bem como as características biológicas que tornam certos genótipos mais virulentos em causar um determinado tipo de doença são de grande importância.

Com base nos resultados obtidos, observa-se uma grande variação genotípica entre os isolados obtidos, o que confirma a diversidade genética no estado do Rio Grande do Sul e no Brasil. Os genótipos do *T. gondii* caracterizados na região de estudo tiveram diferentes combinações de alelos, não sendo encontrado os três genótipos clonais (I, II e III) definidos. Estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a relação entre os genótipos observados e a epidemiologia da doença na população animal e humana.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso animal protocolo (CEUA-UFSM 049 / 2012).

REFERÊNCIAS

- Brandão, G.P. Ferreira A.M., Melo M.N. & Vitor R.W.A. 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite*, 13:143-149.
- Dardé, M.L., Bouteille, B.; Pestre-Alexandre, M. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. *The J. Parasit.*, 78: 786-794.
- De Oliveira, L.N., Costa Junior L.M., De Melo C.F., Ramos Silva J.C., Bevilaqua C.M.L., Azevedo S.S., Muradian V., Araújo D.A.F.V., Dubey J.P. & Gennari S.M. 2009. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast region of Brazil. *J. of Parasit.*, 95:235-237.
- Dubey, J.P. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasit.*, 74: 75-77.
- Dubey, J.P. 2002. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet. Parasitol.*, 106:121-153.
- Dubey, J.P. 2010. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health*, 57:60-73.
- Dubey, J. P.; Graham, D. H.; Blackston, C. R.; Lehmann, T.; Gennari S. M.; Ragozo, A. M. A., nishi, S. M., Shen, S. K.; Kwok O. C. H.; Hill, D. E.; Thulliez, P. 2002. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Internat. J. Parasit.*, 32: 99-105.
- Dubey, J.P., Graham, D.H., Silva, D.S., Lehmann, T., Bahia-Oliveira, L.M.G., 2003a. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. *J. Parasitol.* 89: 851–853.
- Dubey, J.P., Navarro, I.T., Graham, D.H., Dahl, E., Freire, R.L., Prudencio, L.B., Sreekumar, C., Vianna, M.C., Lehmann, T., 2003b. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Vet. Parasitol.* 117: 229– 234.
- Dubey, J.P.; Navarro, I.T.; Sreekumar, C.; Dahl, E.; Freire, R.L.; Kawabata, H.H.; Vianna, M.C.B.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Thulliez, P.; Lehmann, T. 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *The J. Parasit.*: 90: 721-726.
- Dubey, J.P., Gennari S.M., Labruna M. B., Camargo L.M.A., Vianna M.C.B., Marcet P.L. & Lehmann T. 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. *The J. of Parasitol.*, 92:36-40.

- Dubey, J.P., Sundar N., Gennari S.M., Minervino A.H.H., Farias N.A. da, Ruas J.L., Santos T.R.B. dos, Cavalcante G.T., Kwok O.C.H. & Su C. 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.*, 143:182-188.
- Dubey, J.P.; Velmurugan, G.V.; Chockalingam, A.; Pena, H.F.J.; Oliveira, L.N.; Leifer, C.A.; Gennari, S.M.; Oliveira, L.M.G.B.; Su, C. 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 157: 299-305.
- Dubey, J.P., Rajendran C., Costa D.G.C., Ferreira L.R., Kwok O.C.H., Qu D., Su C., Marvulo M.F.V., Alves L.C., Mota R.A., & Silva J.C.R. 2010. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *The J. of Parasitol.*, 96:709-712.
- Ferreira, A.M., Martins, M.S., Vitor, R.W.A., 2001. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite* 8, 99–105.
- Ferreira, A.M., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 6,22–31.
- Garcia, J.L., Navarro I.T., Ogawa L. & Marana E.R.M. 2000. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, 30:123-127.
- Howe, D.K.; Sibley, L. D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Inf. Diseases.*, 172: 1561-1566.
- Pena, H.F.J.; Soares, R.M.; Amaku, M.; Dubey, J.P.; Gennari, S.M. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res. Vet. Scie.*, 81: 58-67.
- Pena, H.F.J.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Su, C. 2008. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Internat. J. Parasit.*, 38: 561-569.
- Pena H.F.J., S.N. Vitaliano, M.A.V. Beltrame, F.E.L. Pereira, S.M. Gennari, R.M. Soares. 2013. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. *Vet. Parasitol.*, 188:225-230.

- Rajendran C., Su C., Dubey J.P. 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect. Genet. Evol.* 12:359–368.
- Ruiz, A. & Frenkel, J.K., 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *The American Society Tropical of Med. Hygien*, 29:1161-1166.
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Boothroyd, J.C., 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends. Parasitol.* 21, 476–481.
- Soares, R.M.; Silveira, L.H.; Silva, A.V.; Ragozo, A.; Galli, S.; Lopes, E.G.; Gennari, S.M.; Pena, H.F.J. 2011 .Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Vet. Parasit.*, 178: 29- 34.
- Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., Sibley, L.D., 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 414–416.
- Su, C.; Zhang, X.; Dubey, J.P. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasit.*. 36: 841-848.
- Su, C., and Dubey, J.P. 2009. *Toxoplasma*. In *Molecular detection of food-borne pathogens*, D. Liu (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 741–753.
- Su, E.K. Shwab, P. Zhou, X. Q. Zhu, and Dubey J. P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasit.* ,137: 1-11.

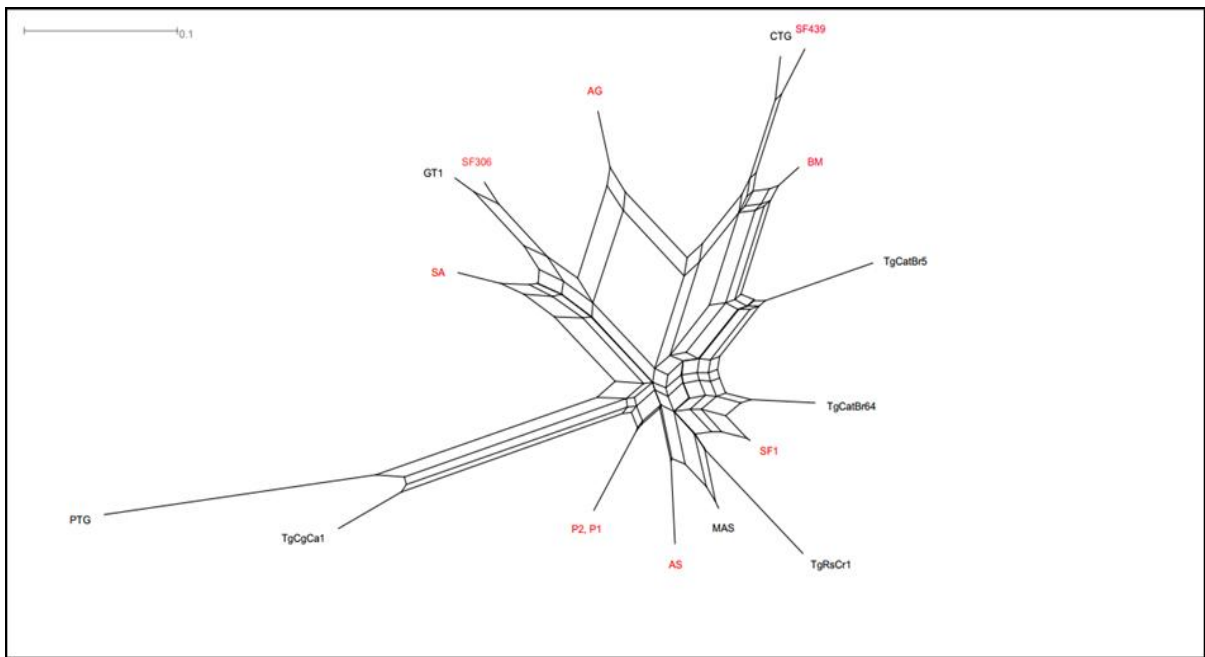


Figura 1. Disposição dos isolados em árvore filogenética criada a partir do método de *neighbor-joining*. Os isolados de Santa Maria estão em vermelho

Tabela 1. Primers para PCR- multiplex, nested-PCR e enzimas utilizadas na RFLP

Marcador	Primers externos (Multiplex-PCR)	Primers internos (nested-PCR)	Enzimas de restrição
SAG 1	F: TTCTAACCACGCACCCTGAG R: AGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: AATGTGCACCTGTAGGAAGC R:TGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	Sau96I+HaeII (double digest).
5' SAG2	F: GCTACCTCGAACAGGAACAC R: GCATCAACAGTCTTCGTTGC	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	Sau3AI
3' SAG2	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: ACGTTTCACGAAGGCACAC	HhaI
,Alt SAG2	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: CCCATCTGCGAAGAAAACG R: TTTCGACCAGCGGGAGCAC	HinfI+TaqI
SAG3	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	NciI
BTUB	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	BsiEI + TaqI (double digest)
GRA6	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	MseI
C22-8	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R:AGGTGCTTGGATATTCCG	BsmAI+MboII (double digest)
C29-2	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC	HpyCH4IV+RsaI (double digest)
L358	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: CAATTCCTCGAAGACAGG	F: GGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	HaeIII+NlaIII (double digest)
PK1	F: AAAGCTGTCCACCCTGAAA R: GAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F:GCAAAGGGAGACAATCAGT R: CATCGCTGAATCTCATTGC	AvaI+RsaI (double digest)
APICO	F:TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R: ACGGAATTAATGAGATTGAA	F:GCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCTTGATA	AflIII+DdeI (double digest)

Tabela 2. Título de anticorpos de galinhas submetidas ao bioensaio e resultado do bioensaio em camundongos

Galinhas	Distrito	Título RIFI	Infectividade dos tecidos das galinhas para os camundongos		
			Dia da Morte ^a	Camundongos positivos (RIFI título \geq 16)	Forma parasitária encontrada
SF306	Santa Flora	256	10	4/4	Taq
SF1	Santa Flora	2048	10	4/4	Taq
SA	Santo Antão	128	60	4/4	Cisto
SF439	Santa Flora	512	60	4/4	Cisto
P1	Pains	1024	12	4/4	Taq
P2	Pains	512	12	4/4	Taq
BM	Boca do Monte	256	60	4/4	Cisto
AS	Arroio do só	128	60	4/4	Cisto
AG	Arroio Grande	512	60	4/4	Cisto
PV	Passo do Verde	64	60	0/4	NE
PA	Palma	64	60	0/4	NE
SV	São Valentin	64	60	0/4	NE

^a Média de dias; NE: não encontrado

Tabela 3. Caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) naturalmente infectadas na zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Isolados	Marcadores											GENÓTIPO
	SAG1	(5'+3') SAG2	Alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22- 8	c29- 2	L358	PK1	Apico	
SF306	I	I	I	I	III	I	u-1	I	I	I	I	ToxoDB #55
SF1	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	u-2	I	ToxoDB #64
SA	I	I	I	III	nd	I	I	I	I	III	II	ND
SF439	II/III	III	III	III	III	III	II	III	III	I	III	ToxoDB #140
P1	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	ToxoDB #11
P2	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	ToxoDB #11
BM	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III	ToxoDB #163
AS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	III	III	III	III	New
AG	I	I	I	III	I	I	II	III	III	I	III	New

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos a partir dos trabalhos desenvolvidos permitem concluir que galinhas domésticas são facilmente infectadas por protozoários, uma vez que estas podem ingerir oocistos encontrados no solo, sendo também consideradas boas indicadores de contaminação ambiental.

Além disso, podemos reafirmar que as galinhas de criação extensiva podem atuar como importantes sentinelas dessa enfermidade, servindo como uma importante fonte de infecção para felinos, humanos e outros animais em propriedades rurais.

A elevada prevalência de anticorpos encontrada neste estudo, além da alta frequência de propriedades com casos positivos, sugere uma grande contaminação ambiental nos locais pesquisados, sendo assim um risco potencial para a saúde humana e animal.

O resultado da análise genotípica dos isolados de galinhas domésticas do presente estudo revelou a presença de cinco genótipos, além de dois outros novos, não descritos anteriormente. Diante disso, se observou uma grande variação genotípica entre os isolados obtidos, o que confirma a diversidade genética no estado do Rio Grande do Sul e no Brasil. Os genótipos do *T. gondii* caracterizados na região de estudo tiveram diferentes combinações de alelos, não sendo encontrado os três genótipos clonais (I, II e III) definidos.

A partir deste estudo, ressalta-se a necessidade de implantação de programas educativos com medidas de prevenção e controle da toxoplasmose, gerando conhecimento para a população com relação aos riscos que estão relacionados com a doença.

REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D. et al. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal of Parasitology** v. 32, p. 27-38, 2002.
- AJZENBERG, D., Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, 34, 1185-1196, 2004.
- ALFONSO, Y. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. **Experimental Parasitology**, v.122, p. 203-207, 2009.
- AL-KHALIDI, N. W.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 331-334, 1979.
- AMENDOEIRA, M. R. R. et al. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, v. 1, p. 15-29. 1999.
- ARAÚJO, W. N. et al., Toxoplasmose: uma zoonose – realidades e riscos. **Cães e Gatos**. v. 79, p. 20-27, 1998.
- BECK, H. P. et al. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 175-189, 2009.
- BIANCIFIORI, F. et al. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v. 9, p. 337-346. 1986.
- BLACKSTON, C. R. et al., High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1472-1475. 2001.
- BOCH, J. et al. Experimentelle Toxoplasma-Infektionen bei Legehennen. Berl. Münch. Tierärztl. **Wochenschr.** v. 79, p. 352-356. 1966.
- BOSSI, P. et al. *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3724-3725, 1998.
- BOSSI, P. et al. Atypical toxoplasmic manifestation after discontinuation of maintenance therapy in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient with immune recovery. **Clinical Infection Disease**. 37, 112-114. 2003.
- BRANDAO, G. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, p. 143-149. 2006.
- BRETAGNE, S. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. **Journal Infection Disease** v.168, p. 1585-1588. 1993.

- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 6, p. 117-118, 1964.
- CARME, B. et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 4037-4044. 2002.
- CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111-122, 2002.
- CENCI-GOGA, B. T. *Toxoplasma* in animals, food and humans: An old parasite of new concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 751-762, 2011.
- COLE, R. A. et al. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**. v. 86, p. 526-530, 2000.
- COLOMBO, F. A. et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 5044-5047, 2005.
- COSTA, A. J. et al. Contribuição ao estudo da toxoplasmose canina. **O Biológico**, v. 45, p. 293-297, 1978.
- COSTA, A. J. et al. Toxoplasmosis frequency in equines from the north region of São Paulo State, Brazil. **Ars Veterinaria**, v. 2, p. 75-79, 1986.
- COSTA, A. J. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 57-62, 2001.
- CRISTINA, N. et al. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis and use in strain characterization. *Experimental Parasitology*, v. 73, p. 73-81, 1991.
- DAGUER, H. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, vol. 34, 2004.
- DARDÉ, M. L. et al. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. v. 39, p. 551-558, 1988.
- DARDÉ, M. L. et al. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 786-794, 1992.
- DARDÉ, M. L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. **Current Topics Microbiology Immunology** . v. 219, p. 27-41, 1996.

- DARDÉ, M. L. et al. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guiana. **Current Topical Microbiology Immunology**, v. 36, p. 32-41, 1998.
- DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, p. 57-63, 2004.
- DA SILVA, D. S. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. **The Journal of Parasitology**, v. 89, p. 394-396, 2003.
- DA SILVA, R. C. et al. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 173-177, 2011.
- DE OLIVEIRA, L. N. et al. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 95, p. 235-237, 2009.
- DOMINGUES, L. M. et al. Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF), **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, p. 79-85, 1998.
- DUBEY, J. P. Taxonomy of *Sarcocystis* and other Coccidia of cats and dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 170, p. 778-782, 1977.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 350-379, 1974.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 350-379, 1974.
- DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pre-pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 199-211, 1983.
- DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Toxoplasma* like-sporozoa in an aborted equine fetus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 11, p. 1312-1313, 1986.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. **CRC Press**, Boca Raton, Florida. 1988. 220 p.
- DUBEY, J. P. et al. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1668-1672, 1993.
- DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 410-415, 1995.
- DUBEY, J. P. et al. Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 839-841, 1997.

- DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 592-602, 1997.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998a.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 862-865. 1998b.
- DUBEY, J. P. et al. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, p. 67-69, 1998c.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75-77, 1998d.
- DUBEY, J. P. et al. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 235-238, 1999.
- DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 121-153, 2002a.
- DUBEY, J. P. et al., Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 99-105, 2002b.
- DUBEY, J. P. et al., *Sarcocystis mephitis* sp. (Protozoa: Sarcocystidae), *Sarcocystis* neuron-like and *Toxoplasma*-like infections in striped skunk (*Mephitis mephitis*). **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 113-118, 2002c.
- DUBEY, J.P. et al. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **The Journal of Parasitology**, v.89, p.851-853, 2003a.
- DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 229-234, 2003b.
- DUBEY, J. P. et al. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 317-322, 2004.
- DUBEY, J. P. et al., Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1082-1093, 2005.
- DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 92, p. 36-40, 2006.

- DUBEY, J. P. et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 18-188, 2007a.
- DUBEY, J. P. Edemic avian toxoplasmosis on a farm in Illinois: clinical disease, diagnosis, biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*), and a goose (*Anser anser*). **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 207-212, 2007b.
- DUBEY, J. P. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 299-305, 2008.
- DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.
- DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 190-195, 2009 a.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2. ed. Boca Raton: CRC, Press, 2009b, p. 1-318.
- DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 60-73, 2010.
- DUBEY, J. P. et al., New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected Findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 709-712, 2010.
- ELLIS, J. T. et al., Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1589-1596, 1999.
- ESTEBAN-REDONDO, I. & INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. 191-196, 1997.
- FAYER, R. Toxoplasmosis update and public health implications. **Canadian Veterinary Journal**, v. 22, p. 344-352, 1981.
- FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra?. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 355-359, 2002.
- FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre - RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 893-897, 2003.
- FIALHO, C. G. et al., Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta scientiae veterinariae**, v. 37, p. 1-23, 2009.

- FRENKEL, J. K. et al. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**. v. 167, p. 893-896, 1970.
- FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis. Mechanisms of infection, laboratory diagnosis and management. **Current Topics in Pathology**. v. 54, p. 29-75, 1971.
- FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: The Coccidia: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related genera. **University Park Press**. p. 343-410, 1973
- FRENKEL, J. K.; et al. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama-City. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**. v. 53, p. 458-468, 1995.
- FRICKER-HIDALGO, H, Diagnosis of Toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation: results of DNA detection and serological techniques. **Clinical Infection Diseases**. v. 48, p. 9-15. 2009.
- FUENTES, I., et al., Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 39, p. 1566-1570, 2001.
- GAMBLE, H. R. et al., Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infections in the domestic pig. **Veterinary parasitology**, v. 128, p. 177-181, 2005.
- GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná - Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, p. 91-97, 1999.
- GLASNER, P. D. et al. 1992. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **Am. J. Ophthalmol.** v. 114, p. 136-144.
- GONDIM, L. S. et al., *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 121-124, 2010.
- GRIGG, M. E. et al. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infection Disease**, v. 184, p. 633-639, 2001.
- GRIGG, M. E., et al., Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p. 161-165, 2001a.
- GRIGG, M.E., et al., Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infection Disease**, v.184, p.633–639, 2001b.
- GRIGG, M. E., Boothroyd, J. C. Rapid identification of virulent typ I strains of the protozoan pathogen *T. gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. **Journal of clinical Microbiology**, v. 39, p. 398-400, 2001c.
- HARTLEY, W. J. et al. New Zeland type II abortion in ewes. **The Australian Veterinary Journal**, v. 30, n. 7, p. 216-218, 1954.

HOMAN, W. L. et al. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 69-75, 2000.

HOSSEININEJAD, M., et al. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 315-319, 2009.

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

HOWE, D. K. et al., Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411-1414, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. Apresenta dado sobre o efetivo dos rebanhos brasileiros. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=7&z=t&o=22&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>>. Acesso em: 28 nov. 2012.

JACOBS, L.; MELTON, M. L. Toxoplasmosis in chickens. **Journal of Parasitology**, v. 52, p. 1158-1162, 1966.

KANETO, C. N. et al. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 203-210, 1997.

KHAN, A. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*, v. 33, p. 2980-2992, 2005.

KHAN A. et al., Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. **Genome Research**, v. 16, p. 1119-1125, 2006.

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

KIJLSTRA, A. et al. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183-190, 2008.

LAPPIN, M. R. et al. Primary and secondary *Toxoplasma gondii* infection in normal and feline immunodeficiency virus-infected cats. **Journal for Parasitology**, v. 82, p. 733-742, 1996.

LARANJEIRA N. L. et al. Prevalência da toxoplasmose equina avaliada pela técnica de imunofluorescência indireta, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 99, p. 158-162, 1985.

LEHMANN, T. et al., Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen coding and house-keeping genes. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 960-971, 2000.

- LEHMANN, T. et al. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infection Genetic Evolution**, v. 4, p. 107-114, 2004.
- LEHMANN, T. et al., Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, p. 11423-11428, 2006.
- LINDSAY et al., Experimental tissue cyst induced *Toxoplasma gondii* infections in dogs. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, p. 113, 1996.
- LINDSAY, D. S. et al., Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocist. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary**, v. 19, p. 448-461, 1997.
- LIN, M. et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4121-4125, 2000.
- LITERA K, I. et al., Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1367-1374, 1998.
- LOPES W. D. Z., et al. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. **Research Veterinary Science**, v. 88, p. 104-106, 2010.
- MACEDO, M. F. S. B. et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012, 21(1): 74-77.
- MACRÍ, G, Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. **Parasitology Research**, v. 105, p. 35-40. 2009.
- MEDINA, L. et al. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 187-191, 2006.
- MELLO, U. Un cas de toxoplasmose du chien observé a Turin. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v. 3, p. 359-363, 1910.
- MENDONÇA, A. O. et al. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equídeos procedentes de duas regiões do Estado da Bahia, Brasil. **Semina Ciências. Agrárias**, v. 22, p. 115-118, 2001.
- MILLER, M. A. et al. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 275-284, 2004.
- MONDRAGON, R. et al. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 639-641, 1998.

- NETO, J. O. A. et al. Prevalence and risk factors for anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 156, p. 329-332, 2008.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur une infection à corps de Leishman (ou organism voisins) du gondi. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris.**, v. 147, p. 736-766, 1908.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur un protozoaire nouveau du gondii. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 148, p. 369-372, 1909.
- OLAFSON, P. & MONLUX, W. S. *Toxoplasma* infection in animals. **Cornel Veterinary medicine**, v. 32, p. 316-326, 1942.
- OLIVEIRA F. C. R. et al. Clínica e hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus*, e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, v. 31, p. 621-626, 2001.
- OWEN, M. R.; TREES, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 382-384, 1999.
- PENA, H. F. J. et al., Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.
- PESCADOR C. A. et al. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 27:167-171, 2007.
- PIERGILI FIORETTI, D. Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. **Parassitologia**, v. 46, v. 177-181. 2004.
- PINHEIRO JUNIOR, J. W. et al. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 105, p. 709-715, 2009.
- RADOSTITS, O. M. et al., Diseases associated with protozoa. In: **Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. Saunders Elsevier, 10th Ed, p. 1483-1540, 2008.
- REITER-OWONA, I. et al. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. **Bull World Health Organization**, v. 77, p. 929-35, 1999.
- ROOS, D. S. et al. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Methods in Cell Biology**. 45:27-63. 1994.
- RUIZ, A.; FRENKEL, J. K., Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 29, p. 1161-1166, 1980.
- SABIN, A. B., Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.

- SAMRA, N. A. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa. **Journal South African Veterinary Association**, v. 78, p. 116-120, 2007.
- SANGER, V. L. et al. Toxoplasmosis. V. Isolation of *Toxoplasma* from cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 123, p. 87-91, 1953.
- SANTOS, S. L. et al. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, **Brazilian Parasitology Research**, v. 106, p. 457-461, 2009.
- SHAAPAN, R. M., et al., Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 359-362, 2008.
- SIBLEY, L. D., BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, p. 82-85, 1992.
- SIBLEY, L. D. et al. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 1669-1677, 1995.
- SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, v. 304, p. 248-253, 2004.
- SILVA, M. S. et al. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 156-159, 2009.
- SINGH, B., Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 1135-1145, 1997.
- SPALDING, S. M. et al. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 105-110, 2002.
- SPALDING, S. M. et al. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p.173-177. 2005.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala - azar dell'umo. Nota preliniare pel, **Revista Social Ciência e Medicina**, v. 03, p. 109, 1908.
- SREEKUMAR, C et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 187-194, 2003.
- SU, C., et al. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, p. 414-416, 2003.

SU, C. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 841-848, 2006.

SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to Molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, p. 1-11, 2010.

TASSI, P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. **Parassitologia**, v. 49, p. 7-15, 2007.

TAYLOR, M. A. et al. **Veterinary Parasitology**. Third Edn. Blackwell Publishing. 2007.

TENTER, A.M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TURNER, C. B.; SAVVA, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in equine eyes. **Veterinary Research**, v. 129, p. 128, 1991.

VAN MAANEN, C. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 351-364, 2004.

VELMURUGAN, G. V. et al., Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 95-99, 2009.

VIDOTTO, O. et al., Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em equinos procedentes de quatro estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, PR. **Semina Ciências Agrárias**, v. 18, p. 9-13, 1997.

ANEXOS

ANEXO 1 – Ficha epidemiológica – toxoplasmose na zona rural de Santa Maria - RS**PROPRIEDADE Nº:** _____ **DATA:** _____**PROPRIETÁRIO:** _____**FONE:** _____**FUNÇÃO:** _____**1. DADOS GERAIS SOBRE A PROPRIEDADE:****1.1. ENDEREÇO (DISTRITO):** _____**1.2. TAMANHO (hectare):** _____**1.3. ATIVIDADE PRINCIPAL:** PECUÁRIA AGRICULTURA MISTA**1.4. ESPÉCIES DE ANIMAIS NA PROPRIEDADE (Número)** Galinhas Equinos Suínos Bovinos Ovinos Cães Gatos**1.5. MANEJO** intensivo extensivo**2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES À TOXOPLASMOSE****2.1. NÚMERO DE PESSOAS QUE MORAM NA PROPRIEDADE:** ADULTOS ADOLESCENTES CRIANÇAS**2.2. PRESENÇA DE ROEDORES** SIM NÃO**2.2.1. LOCAIS ONDE SÃO OBSERVADOS** DEPÓSITO DE RAÇÃO CURRAL RESIDÊNCIA OUTROS NÃO SABE**2.3. PRESENÇA DE GATOS** SIM NÃO ADULTOS JOVENS**2.3.1. OS GATOS TÊM ACESSO A:** DEPÓSITO DE RAÇÃO FENO SILAGEM CURRAL PASTAGEM DEPÓSITO DE ÁGUA HORTA**2.4. ABASTECIMENTO DE ÁGUA (HOMEM)** REDE PÚBLICA POÇO CONVENCIONAL MINA POÇO ARTESIANO NÃO SABE OUTROS: _____**2.5. ABASTECIMENTO DE ÁGUA (ANIMAIS)** REDE PÚBLICA POÇO CONVENCIONAL MINA REPRESA AÇUDE PLUVIAL CÓRREGO OUTROS _____

2.6. A ÁGUA CONSUMIDA É ARMAZENADA EM CAIXA D'ÁGUA :

() SIM () NÃO

2.7. A FONTE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA ESTÁ PRÓXIMA À:

() CURRAL () ESGOTO () PRIVADA () CANIL

() OUTRO _____

2.8. OCORRE ABATE DE ANIMAIS NA PROPRIEDADE, PARA CONSUMO PRÓPRIO?

() SIM () NÃO

2.8.1. INGESTÃO DE CARNE E DERIVADOS DA PROPRIEDADE:

() SIM () NÃO

2.8.2. DE QUAIS ESPÉCIES :

() AVES () OVINOS () BOVINOS () SUÍNOS () SILVESTRES

2.8.3. QUAL A FREQUENCIA:

() DIARIAMENTE () SEMANALMENTE () MENSALMENTE

2.8.4. APÓS TEMPERAR, VOCÊ EXPERIMENTA A CARNE ANTES DE COZINHAR?

() SIM () NÃO

2.8.5. TIPO DE CARNE CONSUMIDA:

() CRUA () MAL PASSADA () COZIDA

2.8.6. QUAIS OS DERIVADOS SÃO CONSUMIDOS?

() LINGUIÇA FRESCAL () LINGUIÇA DEFUMADA

() outro _____

2.9. HISTÓRICO DE TOXOPLASMOSE NOS MORADORES?

() SIM () NÃO () NÃO SABE

2.10. JÁ REALIZARAM ALGUM EXAME DE SANGUE PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*

() SIM () NÃO () NÃO SABE

2.10. GESTANTES NA PROPRIEDADE:

() SIM () NÃO

2.11. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Folder – Informativo entregue aos proprietários, sobre toxoplasmose.

COMO PREVENIR A TOXOPLASMOSE?

- Evitar o acesso dos gatos em depósitos de ração e em hortas
- Lavar bem as frutas e verduras
- Evitar a ingestão de carnes cruas ou mal passadas

COMO PROTEGER OS BEBÊS?

As mulheres gestantes devem tomar os seguintes cuidados.

- fazer o exame pré-natal
- usar luvas quando for trabalhar em hortas e jardins
- comer frutas e verduras bem lavadas
- Cozinhar bem a carne antes de ingerir



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA VETERINÁRIA PREVENTIVA
LABORATÓRIO DE DOENÇAS PARASITÁRIAS

ladopar

Laboratório de Doenças Parasitárias-UFSM

Avenida Roraima, 1000, Prédio 44, Sala
5149, Bairro Camobi,
Santa Maria, RS.
Fone: (055) 3220-8071

TOXOPLASMOSE



VOCÊ JÁ OUVIU FALAR EM TOXOPLASMOSE?

A toxoplasmose é a doença causada por um parasito que se multiplica no intestino do gato doméstico ou silvestre e que, nos humanos, pode causar febre, paralisia e cegueira. Quando atinge o bebê, ainda na gestação, pode causar além da cegueira, problemas neurológicos.

QUEM PODE TER TOXOPLASMOSE?

- Pessoas que entram em contato com a terra de jardim e horta, onde os gatos costumam defecar, sem usar luvas ou lavar bem as mãos depois do trabalho
- As crianças que brincam em caixas de areia onde os gatos podem defecar, em parques, escolas, creches, etc.
- Quem come frutas e verduras mal lavadas ou sem lavar, carne crua, por exemplo, quando preparam salames e outros embutidos
- Quem toma água de rio e lagoa. Mesmo que pareçam estar limpas, podem conter os oocistos do parasita
- Bebês de mães que tiveram a doença durante a gravidez

CICLO DA TOXOPLASMOSE



O gato ingere um alimento contaminado com o parasita *Toxoplasma gondii*



O gato infectado dissemina a doença pelas fezes e contamina o solo, água e alimentos que são ingeridos pelos animais e pelo homem.



FORMAS DE TRANSMISSÃO

A via mais comum de transmissão da toxoplasmose é pela ingestão de **carnes cruas ou mal cozidas**, ou ainda **verduras mal lavadas** cultivadas em hortas em que os gatos tenham livre acesso. Além disso, a transmissão **transplacentária**, da mãe para o bebê.

