



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS- CCA  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL



**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* OBTIDOS DE GALINHAS DE CRIAÇÃO LIVRE NA ILHA DE SÃO LUÍS - MA**

ISABELLA CHAVES SOUSA

São Luís - MA

2015

ISABELLA CHAVES SOUSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* OBTIDOS DE GALINHAS DE CRIAÇÃO LIVRE NA ILHA DE SÃO LUÍS - MA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –  
Graduação em Ciência Animal da Universidade  
Estadual do Maranhão - UEMA como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal.

**Área:** Medicina Veterinária Preventiva

**Orientadora:** Profa. Dra. Francisca Neide Costa

São Luís – MA  
2015

Sousa. Isabella Chaves

Isolamento e caracterização genotípica de isolados *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre na ilha de São Luís - MA / Isabella Chaves Sousa – São Luís, 2015.

62 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Francisca Neide Costa

1.Toxoplasma. 2.PCR-RFLP. 3.Bioensaio. 4.Galinhas. I.Título

CDU: 616.993.1:636.52/58(812.1)

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 22/05/2015 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:



---

**Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena (USP)**  
**1º membro**



---

**Professor Dr. Livio Martins Costa Júnior (UFMA)**  
**2º Membro**



---

**Professora Dra. Francisca Neide Costa (UEMA)**  
**Orientadora**

*A um anjinho chamado  
Laura Freitas Chaves...*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar pelos caminhos certos e me conceder saúde e força para concluir mais essa importante etapa de minha vida.

À Minha Nossa Senhora por sempre interceder junto a seu Filho para minhas preces serem ouvidas.

À minha mãe, Rosa, e à minha mamãe-titia, Maria Lúcia, por todas as orações feitas a meu favor durante o mestrado, por todos os cuidados a mim dispensados e pela companhia nos diversos momentos que precisei.

Ao meu amor, meu marido Sérgio Eduardo, por ter me dado mais uma família maravilhosa, ser o meu porto-seguro em todos os momentos de ansiedade e nervosismo e por NUNCA medir esforços para me ajudar.

Aos meus irmãos Fabíola, Gabriella e Hugo, e meus cunhados Joelson, Cesar e Flávia, por serem pessoas que sempre me serviram de espelho, tanto pela inteligência quanto pela determinação e competência em tudo que fazem. À Gabriella e ao Cesar, agradeço ainda pelo caloroso acolhimento em São Paulo.

Aos meus sobrinhos e afilhados, Maria Clara, Pedro Vinícius, Heitor e Laís Maria que são presentes de Deus em minha vida e só me dão alegrias e motivos para seguir em frente.

Ao meu pai, Meton, por ter me ajudado a dar o ponta pé inicial nesta pesquisa e por seu exemplo de sempre correr atrás de seus sonhos.

A toda minha família e amigos, por serem uma base tão forte para meu desenvolvimento.

À professora e minha orientadora, Francisca Neide, por toda a atenção, força e sabedoria disponibilizados a mim durante o período de mestrado.

À professora Solange Gennari, por me abrir as portas do Laboratório de Doenças Parasitárias – VPS/FMVZ/USP e permitir que parte desse experimento fosse realizada lá.

À professora Hilda Pena, pelo tempo dispensado à minha pesquisa e, principalmente, por todos os ensinamentos prestados, pois sem eles este trabalho não poderia ser realizado.

À UEMA pela possibilidade de realização desta pós-graduação, bem como por todos os equipamentos, instalações físicas e ajuda de custo disponibilizados durante esta pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o período do mestrado.

A todos do Laboratório Cernitas, em especial o Prof. Daniel Chaves, por toda a ajuda concedida durante esta pesquisa e por sempre ser um grande incentivador da minha vida acadêmica e profissional.

A todos os técnicos, estagiários e pesquisadores do Laboratório de Microbiologia de alimentos e água da Universidade Estadual do Maranhão, em especial à Arlene, Luciana, Eliane, Lígia, Éricka, Rafael, Rosiclea, prof. Felício, D. Ruth e Monique, pela ajuda nos momentos difíceis e pelas risadas de sempre.

À minha amiga Larissa Sarmiento, que quando eu achava que nada iria dar certo aparecia para me dar auxílio e tornar tudo mais fácil.

Aos Laboratórios de Parasitologia, Fisiologia e Anatomopatologia da Universidade Estadual do Maranhão, representados pelos professores Ana Clara Gomes dos Santos, Antônia Santos Oliveira e Fábio Henrique Evangelista.

À coordenação, representada pela professora Alana Lislea, e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UEMA.

A todos os técnicos, estagiários e pesquisadores do Laboratório de Doenças Parasitárias - VPS da Universidade de São Paulo (USP) com quem tive o prazer de conviver, em especial à Alessandra, Juliana, Fabiana, Herbert e Natália.

À Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão e todos os seus colaboradores.

A todos os funcionários e colaboradores desta instituição que sempre me ajudaram com um sorriso no rosto, em destaque a Fran, d. Socorro, sr. Manoel (biotério), sr. Emerson, sr. Agnaldo e Nilson.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma participaram e contribuíram para que esta pesquisa fosse realizada.

*“Qualquer trabalho que não exija superação,  
não lhe proporcionará crescimento.  
Qualquer trabalho que não desafie os seus  
limites, não lhe proporcionará crescimento.  
Qualquer trabalho que não produza uma certa  
vontade de desistir em alguns momentos,  
não lhe proporcionará crescimento.  
Qualquer trabalho que seja confortável 100% do  
tempo e apenas exija poucas horas de dedicação  
diária, não lhe proporcionará crescimento.  
Qualquer trabalho que não proporcione  
crescimento, simplesmente não serve.”*

Autor Desconhecido

SOUSA, I. C. **Isolamento e caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre na ilha de São Luís – MA.** [Isolation and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from free range chickens in Sao Luis island, Maranhao, Brazil]. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2015.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário de distribuição mundial que infecta praticamente todos os vertebrados homeotérmicos, incluindo o ser humano. Apesar do gênero *Toxoplasma* ser considerado monoespecífico, três linhagens clonais clássicas são descritas para isolados principalmente da América do Norte e Europa. Entretanto, estudos vem mostrando que diversos isolados encontrados, particularmente no Brasil, são diferentes dos tipos clássicos, com a presença de linhagens clonais específicas e genótipos atípicos. Com o objetivo de isolar e caracterizar genotipicamente cepas do referido protozoário encontradas em galinhas de criação livre naturalmente infectadas nos municípios da ilha de São Luís – MA, 60 aves (*Gallus domesticus*) passaram por triagem sorológica pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e amostras de coração e cérebro das soropositivas foram encaminhadas para bioensaio em camundongos. Os isolados obtidos no bioensaio foram genotipados através da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase, método de Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de DNA gerados por enzimas de restrição (PCR-RFLP), usando os marcadores SAG1, 3'SAG2, 5'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. A frequência de infecção por *T. gondii* nas aves examinadas através da RIFI foi de 25,0% (15/60). Cinco isolados de *T. gondii* foram obtidos e 4 genótipos distintos descritos, sendo que um deles não há registro na literatura, portanto, isolado pela primeira vez na presente pesquisa. Linhagens clonais clássicas do tipo I, II e III não foram encontradas, mas a linhagem clonal brasileira Bri foi identificada. Os resultados obtidos corroboram com estudos já desenvolvidos em outras regiões do Brasil, indicando uma alta diversidade genética de *T. gondii*.

**Palavras-chave:** toxoplasma, PCR-RFLP, bioensaio, galinhas.

SOUSA, I. C. **Isolamento e caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre na ilha de São Luís – MA.** [Isolation and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from free range chickens in Sao Luis island, Maranhao, Brazil]. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2015.

### ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is a protozoan with a worldwide distribution that infects virtually all warm-blooded vertebrates, including humans. Despite the *Toxoplasma* genus being considered monospecific, three classical clonal lineages are described for isolates mainly from North America and Europe. However, some researches have shown that many isolates that were found, particularly in Brazil, are different from the classic types, with the presence of specific clonal lineages and atypical genotypes. In order to isolate and characterize genotypically strains of said protozoan found in free-range chickens naturally infected in the municipalities of the Sao Luis island – MA, 60 chickens (*Gallus domesticus*) were undergone to serologic screening by Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). Heart and brain samples from seropositive chickens were submitted to bioassay in mice. The isolates obtained from bioassay were genotyped by Polymerase Chain Reaction, method Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), using the markers SAG1, 3'SAG2, 5'SAG2, alt .SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8 , c29-2, L358, PK1, Apico and CS3. The frequency of *T. gondii* infection in examined chickens by IFAT was 25.0% (15/60). Five isolates of *T. gondii* were obtained and four different genotypes were described. One of them was not recorded in the literature, thus, first isolated in this study. Classic clonal lineages of type I, II and III were not found, but the Brazilian clonal lineage BrI was identified. The results corroborate with studies already developed in other regions of Brazil, indicating a high genetic diversity of *T. gondii*.

**Key words:** Toxoplasma, PCR-RFLP, bioassay, chickens.

## LISTA DE TABELAS

p.

- Tabela 1.** Frequência de aves (*Gallus domesticus*) soropositivas para anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo o sexo e o município de procedência na Ilha de São Luís – MA, 2015. .... 39
- Tabela 2.** Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos pela Reação de Imunofluorescência (RIFI) em aves (*Gallus domesticus*) naturalmente infectadas na ilha de São Luís – MA, 2015..... 40
- Tabela 3.** Número de bioensaios realizados e número de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos por município da ilha de São Luís – MA, 2015..... 40
- Tabela 4.** Relação entre o título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* das aves soropositivas, o número de bioensaios realizados e o número de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos, São Luís – MA, 2015..... 41
- Tabela 5.** Número de infectados, percentual de óbitos e sobrevivência de camundongos em grupos do bioensaio com obtenção de isolados de *Toxoplasma gondii*, de acordo com município de procedência e títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* das aves, São Luís – MA, 2015. .... 43
- Tabela 6.** Genótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de galinhas de criação livre pela técnica de PCR-RFLP, provenientes dos municípios da ilha de São Luís-MA, 2015. .... 44
- Tabela 7.** Município de procedência, percentual de óbitos e isolados obtidos nos diferentes grupos de camundongos bioensaiados, 2015..... 45

## LISTA DE QUADROS

p.

- Quadro 1.** Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* observada em galinhas de criação livre em diferentes países. ....26
- Quadro 2.** Marcadores moleculares, oligonucleotídeos (primers) e enzimas de restrição utilizadas na PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de isolados de *T. gondii* em galinhas de criação livre nos municípios da ilha de São Luís, MA. .... 36
- Quadro 3.** Perfis de PCR-RFLP Multilocal das amostras clonais Tipos I, II e III e amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controle neste estudo. .... 38

## LISTA DE FIGURAS

	<b>p.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo Biológico do <i>T. gondii</i> .....	20
<b>Figura 2.</b> Localização dos municípios de São Luís, Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa.....	30
<b>Figura 3.</b> Taquizoíta isolado do pulmão de camundongo bioensaiado..	41
<b>Figura 4.</b> Cisto tecidual em cérebro de camundongo bioensaiado ..	42

## SUMÁRIO

	<b>p.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Geral .....	16
2.2 Específicos.....	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
3.1.1 Histórico .....	17
3.1.2 Taxonomia.....	18
3.1.3 Formas Infectantes.....	18
3.1.3.1 Taquizoítas.....	18
3.1.3.2 Bradizoítas .....	19
3.1.3.3 Esporozoítas (oocistos).....	19
3.1.4 Ciclo Biológico.....	20
3.1.5 Formas de Transmissão .....	22
3.1.6 Aspectos Epidemiológicos .....	22
3.1.7 Toxoplasmose em humanos.....	24
3.1.8 Toxoplasmose em animais.....	25
3.1.9 Métodos Diagnósticos .....	27
3.1.10 Caracterização Molecular e populacional de <i>T. gondii</i> .....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Local do Experimento .....	30
4.2 Obtenção das aves .....	30
4.3 Obtenção e Processamento das Amostras de Sangue .....	31
4.4 Teste Sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> .....	31
4.5 Digestão Péptica dos Tecidos .....	32
4.6 Bioensaio em camundongos .....	33
4.6.1 Delineamento Experimental .....	33
4.6.1.1 Pesquisa de <i>T. gondii</i> .....	34
4.7 Análise Genotípica .....	34
4.7.1 Amostras Positivas (Isolados) .....	34
4.7.2 Extração do DNA .....	34
4.7.4 PCR-RFLP Multilocal .....	35
<b>5 RESULTADOS</b> .....	39
5.1 Sorologia das aves (RIFI) .....	39

5.2 Bioensaio em camundongos e isolamento de <i>T. gondii</i> .....	40
5.3 Análise Genotípica .....	43
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>APÊNCIDE A - NÚMERO DE AVES (<i>Gallus domesticus</i>) ADQUIRIDAS POR COLETA, DE ACORDO COM O SEXO, NOS DIFERENTES MUNICÍPIOS E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DAS CRIAÇÕES</b> .....	61
<b>APÊNCIDE B - VISUALIZAÇÃO DE LOCAIS ONDE AS AVES (<i>Gallus domesticus</i>) CONVIVEM NATURALMENTE COM FELINOS E OUTRAS ESPÉCIES ANIMAIS</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii*, única espécie do gênero *Toxoplasma*, é um protozoário parasito intracelular obrigatório de distribuição mundial que infecta praticamente todos os vertebrados homeotérmicos, incluindo o ser humano e tem como hospedeiros definitivos os felídeos, que são os únicos capazes de eliminar oocistos em suas fezes, embora os demais animais como hospedeiros intermediários, possam abrigar cistos teciduais infectantes (DUBEY, 1998a).

As infecções felinas, tipicamente subclínicas, ocorrem geralmente após o nascimento através da ingestão de cistos teciduais infectados ou mais raramente pela ingestão de oocistos, embora possam ocorrer também infecções congênitas (ELMORE et al., 2010). Em hospedeiros intermediários, como o homem e outros animais, a infecção pós-natal ocorre principalmente através da ingestão de cistos teciduais a partir de carne crua ou mal-passada, ou de oocistos esporulados oriundos das fezes de felinos, presentes no solo, água e alimentos (DUBEY et al., 2003).

A maioria dos humanos infectados após o nascimento são assintomáticas, embora alguns pacientes possam desenvolver quadros de febre, dores de cabeça, mialgia, linfadenopatia, lesões oculares e mais raramente, encefalite, hepatite, miocardite e pneumonia. Em pacientes imunocomprometidos a neurotoxoplasmose, com graves alterações neurológicas, é comumente descrita. A toxoplasmose congênita, ocasionada pela infecção materna durante a gestação, pode levar à má-formações do feto, aborto ou graves alterações neurológicas e oculares nas crianças infectadas (ELMORE et al., 2010; DUBEY et al., 2012).

A toxoplasmose é considerada uma das infecções parasitárias mais comuns do ser humano e de vários animais domésticos e selvagens, chegando-se a estimar que a exposição pelo seu agente etiológico, *T. gondii*, tenha atingido aproximadamente um terço da população humana mundial (DUBEY, 1996), sendo válido frisar que a sua prevalência é variável, conforme hábitos socioculturais, fatores geográficos e climáticos (TENTER et al., 2000).

Diante de sua natureza versátil, diversas espécies animais são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, apresentando variadas taxas de soropositividade e sinais clínicos. Diversos estudos sobre a prevalência de infecção por *T. gondii* em galinhas domésticas vem sendo realizados em várias partes do mundo, sendo este interesse despertado pelo fato destes animais terem o hábito de “ciscar”, se alimentando a partir do solo, podendo assim, ingerir oocistos esporulados no ambiente, sendo portanto, um bom indicador da presença de cepas do protozoário no ambiente em questão (RUIZ e FRENKEL, 1980; DUBEY et al., 2003). Além disso, um aspecto importante relacionado a prevalência de *T. gondii* em aves é o papel de

reservatório que esses animais desempenham na transmissão da toxoplasmose para carnívoros, em especial aos felinos, com instintivo hábito predatório (DUBEY e FRENKEL, 1998).

Diante do curto período de criação e do confinamento dos animais, que impede o contato das aves com os felinos, as criações de frango em escala industrial apresentam pequena importância na epidemiologia da toxoplasmose, diferentemente da produção doméstica de galinhas em pequena escala, onde as aves geralmente são criadas livres e permanecem por longos períodos em um mesmo ecossistema, favorecendo sua infecção pelo *T. gondii* (SANTOS, 2012).

Mesmo o gênero *Toxoplasma* sendo considerado mono específico, a espécie *T. gondii* foi considerada durante muitos anos como tendo três linhas clonais (tipos I, II e III) definidas a partir de um sistema de tipificação baseado na diferenciação multilocus por PCR-RFLP utilizando como marcador o gene SAG2, com amostras oriundas da Europa e Estados Unidos, onde os tipos I e II estavam associados à toxoplasmose clínica em humanos, e os tipos II e III provenientes de isolados obtidos de animais, independente do estado clínico dos mesmos (HOWE e SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997). Estudos posteriores, entretanto, vem mostrando que diversos isolados encontrados, particularmente no Brasil, são diferentes dos tipos clássicos I, II e III (DUBEY et al., 2006a; PENA et al., 2008; DUBEY e SU, 2009; HOLSBACK et al., 2012). Além disso, Dubey et al. (2005c) e Ragozo (2007) afirmam que a virulência observada entre as amostras de *T. gondii* obtidas no Brasil, tem se mostrado elevada quando comparada com a de isolados de outras localidades.

Segundo Silveira (2009), diante do potencial zoonótico da toxoplasmose, é de fundamental importância para um maior entendimento sobre a doença, o estudo de genótipos oriundos de infecções animais correlacionando a variante isolada com suas propriedades biológicas, assim como estudar a epidemiologia do agente, identificando fatores como fontes de infecção e vias de transmissão.

Levantamentos soropidemiológicos para *T. gondii* têm sido reportados para animais domésticos e humanos no estado do Maranhão, em especial na ilha de São Luís (BRANDÃO et al., 2009; COSTA et al., 2010; BRAGA et al. 2012) entretanto, estudos envolvendo a caracterização genética e biológica do parasito são praticamente inexistentes, o que gera lacunas no conhecimento sobre a epidemiologia da toxoplasmose na região. Diante do exposto, o presente trabalho busca contribuir com informações para elucidar os conhecimentos epidemiológicos sobre referido protozoário, com os objetivos que se seguem:

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Realizar o isolamento e a caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* encontradas em galinhas de criação livre naturalmente infectadas na ilha de São Luís – MA;

### **2.2 Específicos**

- Determinar pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* entre as galinhas de criação livre analisadas;
- Isolar *T. gondii* a partir dos tecidos das aves soropositivas para *T. gondii* por meio do bioensaio em camundongos;
- Caracterizar genotipicamente os isolados obtidos por meio da técnica de PCR-RFLP usando os marcadores SAG1, 3'SAG2, 5'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3;
- Fornecer informações relevantes para a elucidação da cadeia epidemiológica de *T. gondii* na Ilha de São Luís e contribuir com novas pesquisa sobre este protozoário.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 *Toxoplasma gondii*

#### 3.1.1 Histórico

*Toxoplasma gondii* foi descoberto acidentalmente por Nicolle e Manceaux (1908), na Tunísia, quando estes pesquisavam parasitos do gênero *Leishmania* em um roedor local chamado *Ctenodactylus gundi*. Em um primeiro momento eles julgaram se tratar de um piroplasma ou uma nova espécie de *Leishmania*, porém, mais tarde perceberam que estavam diante de um novo gênero, denominado então de *Toxoplasma*, do grego *toxon*=arco e *plasma*=corpo, em consonância com a morfologia do parasito. Fazendo alusão ao hospedeiro onde o micro-organismo foi identificado, *C. gundi*, a espécie foi registrada como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909). É válido ressaltar que no Brasil, Splendore (1908) identificou o mesmo parasito em coelhos, porém, também acreditou se tratar de uma espécie de *Leishmania*).

Após sua descoberta, *Toxoplasma gondii* foi identificado em diversas espécies animais, como em pombos e cães (CARINI, 1911), e no homem, com o primeiro relato sendo feito por Jankü (1923), na Tchecoslováquia, onde o parasito foi encontrado durante a necropsia de uma criança que veio a óbito em decorrência de uma doença grave, com hidrocefalia, microftalmia e coloboma na região macular. Apesar destes registros, somente Sabin (1939) conseguiu comprovar através de estudos de características biológicas e imunológicas dos isolados obtidos, que os achados em animais e humanos envolviam a mesma espécie.

Mesmo com conhecimentos sobre a possibilidade de transmissão transplacentária e através da ingestão de tecidos infectados, até meados da década de 60 o ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* permaneceu desconhecido, pois até então somente os estágios assexuados do parasito haviam sido identificados (taquizoítas e bradizoítas) (DUBEY, 2009).

O papel do gato no ciclo evolutivo do parasito começou a ser esclarecido quando em 1965, Hutchison afirmou que estes animais eliminavam *T. gondii* pelas fezes e a forma eliminada deveria ser resistente ao ambiente, identificando assim os oocistos (HUTCHISON, 1965). Alguns anos depois, Frenkel et al. (1970), nos EUA, descreveram a fase sexuada do ciclo de vida do *T. gondii*, que ocorre no epitélio intestinal de felídeos e culmina com a eliminação de oocistos no ambiente. Dessa forma, o papel dos felídeos como hospedeiros definitivos deste agente etiológico foi definido e estratégias para a prevenção da doença foram estudadas.

### 3.1.2 Taxonomia

*Toxoplasma gondii* pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* (LEVINE, 1988).

Dubey (2010) relata o gênero *Toxoplasma* como sendo monoespecífico, tendo *T. gondii* como sua única espécie. Levine (1988), por sua vez, considera que o gênero possui outras espécies, mas a existência das mesmas não é comprovada (FERREIRA e VITOR, 2014).

### 3.1.3 Formas Infectantes

*T. gondii* possui três formas infectantes distintas: os taquizoítas, os bradizoítas (em cistos teciduais) e os esporozoítas (em oocistos) (TENTER et al., 2000; JONES e DUBEY, 2010). Cada uma dessas formas possui diferenças quanto à infectividade de acordo com o hospedeiro (DUBEY, 2006), onde, segundo Dubey (1998a), os bradizoítas contidos em cistos teciduais são os mais efetivos na infecção de felídeos quando comparado às outras formas.

#### 3.1.3.1 Taquizoítas

Os taquizoítas, anteriormente chamado de trofozoítos ou endodizoítos, são o estágio móvel, obrigatoriamente intracelular e de rápida multiplicação de *T. gondii*, responsáveis pela fase aguda das infecções. Sua multiplicação pode ocorrer em qualquer célula do corpo dos hospedeiros intermediários e nas células não intestinais dos hospedeiros definitivos. Os taquizoítas têm formato de meia lua, com uma extremidade pontiaguda e outra mais arredondada. Eles penetram nas células do hospedeiro geralmente de maneira ativa, onde são rodeados por um vacúolo parasitóforo e dentro destes realizam sua multiplicação por endodiogenia, uma forma especializada de multiplicação assexuada, onde duas células-filhas se formam no interior da célula-mãe (DUBEY et al., 1998).

Segundo Dubey et al. (1998), não existe um período de latência específico para início das multiplicações após o taquizoíta penetrar em uma célula hospedeira, este fato dependerá da virulência da cepa de *T. gondii* em questão.

Quando a replicação é finalizada, os taquizoítas deixam o vacúolo, rompem a membrana plasmática da célula hospedeira e chegam no meio extracelular, onde são disseminados por via hematogênica ou linfática para os diversos tecidos (DUBEY, 1998a).

### 3.1.3.2 *Bradizoítas*

O termo bradizoíta descreve a forma infectante de *T. gondii* que ocorre dentro de cistos teciduais e possui multiplicação lenta. Eles são derivados de taquizoítas que no interior de células hospedeiras, por mecanismos ainda não bem esclarecidos passam por multiplicações e modificações estruturais, onde há alterações na membrana e na matriz do vacúolo parasitóforo, formando uma parede cística e dando origem a um cisto tecidual, característico da fase crônica da infecção (BARBOSA et al., 2014).

Os cistos teciduais atingem tamanhos variados de acordo com o tempo de formação. Cistos jovens medem cerca de 5 mm de diâmetro e possuem apenas dois bradizoítas em seu interior, enquanto cistos mais velhos podem ter centenas destes, e atingir até 100 mm de diâmetro. Apesar dos cistos poderem se desenvolver nos mais variados órgãos, a predileção está no tecido nervoso e muscular, incluindo cérebro, olhos, músculos cardíacos e esqueléticos. Cistos teciduais intactos provavelmente não causam nenhum dano e pode persistir durante a vida do hospedeiro sem causar uma resposta inflamatória do hospedeiro (DUBEY et al., 1998).

Quanto ao período necessário para a formação de cistos, Dubey e Frenkel (1976) relatam que evidenciaram a formação de cistos teciduais em camundongos experimentalmente infectados em apenas 3 dias após a inoculação de taquizoítas. Mas que um período de 11 a 17 dias pode ser considerado como a transição em taquizoítas e bradizoítas.

Em algumas situações durante o curso da infecção os cistos teciduais podem se romper e os bradizoítas contidos nele serem convertidos em taquizoítas, que por sua vez reinvadem células hospedeiras e se rediferenciam em bradizoítas, formando novos cistos teciduais. Este processo ainda não totalmente esclarecido tem ligação com o estado imunológico do paciente e é comum em portadores de AIDS (DUBEY, 2009).

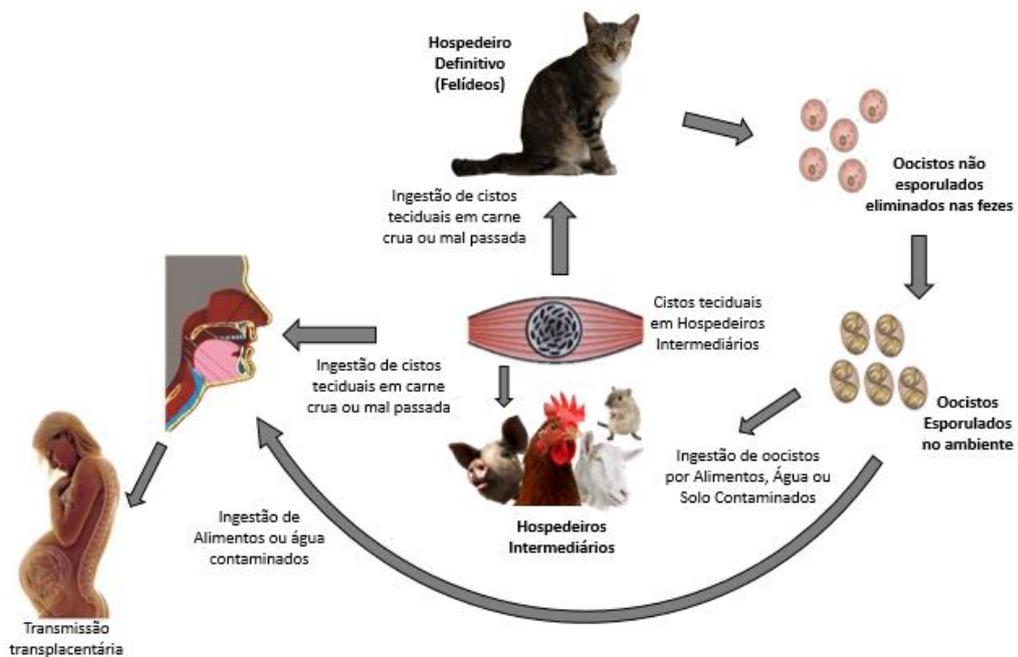
### 3.1.3.3 *Esporozoítas (oocistos)*

Os oocistos contêm formas de vida de *T. gondii* originadas a partir do ciclo sexuado do parasito que ocorre apenas no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos, de onde são eliminados para o ambiente ainda imaturos (cerca de 100 mil oocistos/g) através das fezes (DUBEY e THULLIEZ, 1993; SCHLÜTER et al., 2014). Em condições ambientais adequadas de umidade e temperatura os oocistos eliminados sofrem um processo de maturação ou esporulação que pode durar de 1 a 5 dias. Neste processo há a formação dos esporozoítas, formas infectantes do parasito (DUBEY, 2004).

Os oocistos não esporulados são esféricos ou subsféricos, podem medir de 10 a 12µm de diâmetro. Os oocistos esporulados possuem formato subsférico ou elíptico, medindo de 11 a 13µm. Cada oocisto esporulado contém no seu interior dois esporocistos e cada esporocisto possui quatro esporozoítas. Dubey (1998a) ratifica ainda que oocistos são estruturas muito resistentes ao meio ambiente, inclusive ao congelamento, podendo sobreviver até 54 meses viáveis em águas frias. Além disso, tais estruturas conseguem resistir a tratamentos físicos e químicos tradicionais em estações de tratamento de água, como a cloração e raios ultravioleta.

### 3.1.4 Ciclo Biológico

Como todos os membros da subfamília Toxoplasmatinae, *Toxoplasma gondii* apresenta ciclo heterógeno facultativo. Além disso, o ciclo deste parasito se caracteriza por duas fases distintas: uma sexuada, que ocorre apenas no tecido epitelial do intestino dos felídeos, hospedeiros definitivos, e resulta na produção de oocistos; e uma assexuada, que produz nos hospedeiros intermediários taquizoítas e bradizoítas (DUBEY et al., 1998; FERREIRA e VITOR, 2014) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo Biológico do *T. gondii*.

Qualquer uma das formas infectantes é capaz de iniciar o ciclo sexuado de *T. gondii* nos felídeos, embora Dubey (1998a), afirme que a ingestão de bradizoítas em cistos teciduais seja mais efetiva na infecção destes hospedeiros, proporcionando na maioria das vezes a

eliminação de oocistos nas fezes, enquanto que com a ingestão de taquizoítas e oocistos menos de 50% dos felídeos chegam a completar o ciclo sexuado e eliminar oocistos (JONES e DUBEY, 2010).

Quando ocorre a ingestão de cistos teciduais pelos hospedeiros definitivos, as paredes desses cistos são dissolvidas por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado, e os bradizoítas são liberados e penetram nas células epiteliais do intestino delgado (DUBEY e FRENKEL, 1972). Tanto esporozoítas, quanto bradizoítas ou taquizoítas, ao penetrarem no epitélio intestinal do gato sofrem processo de multiplicação, que leva ao rompimento da célula parasitada libera formas denominadas merozoítas, que penetram em novas células epiteliais e se transformam nas formas sexuadas masculina e feminina, os gametócitos, que após um processo de maturação formam os gametas masculinos móveis microgametas, e femininos móveis, macrogameta. Os macrogametas permanecerão dentro de uma célula epitelial, enquanto que os microgametas sairão de sua célula e irão fecundar o macrogameta. Após o gameta masculino fertilizar o gameta feminino, uma parede é formada ao redor do gameta feminino (zigoto) a fim de formar o oocisto imaturo, que será liberado com as fezes logo após o rompimento da célula epitelial. No ambiente, em condições favoráveis, o oocisto leva de 1 a 5 dias para se tornar maduro e infectante (JONES e DUBEY, 2010).

O tempo necessário para o felídeo iniciar a liberação de oocistos nas fezes vai depender da forma infectante ingerida. Em média, essa eliminação demora cerca de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais, no mínimo 13 dias após a ingestão de taquizoítas e a partir de 18 dias após a ingestão de oocistos (DUBEY, 1998a; DUBEY, 2004).

Cabe ressaltar que os felídeos primoinfectados, geralmente jovens, eliminam milhões de oocistos por até três semanas, e em seguida adquirem imunidade que impede nova liberação de oocistos. Entretanto, Dubey (1995) em condições laboratoriais, verificou uma nova eliminação de oocistos em gatos ao fornecer a estes tecidos infectados com cistos de *T. gondii* após 6 anos da primeira infecção. Ele afirma ainda que situações como infecções concomitantes, desnutrição e doenças imunossupressoras podem favorecer uma nova liberação de oocistos.

Nos hospedeiros intermediários, por sua vez, quando há a ingestão de cistos teciduais ou oocistos, as paredes destes são rompidas por degradação enzimática e as formas infectantes (bradizoítos, taquizoítos ou esporozoítos) são liberadas no lúmen intestinal, onde penetram as células e formam um vacúolo citoplasmático, onde sofrerão sucessivas divisões por endodiogenia dentro da célula, tornando-se taquizoítos. As células infectadas se rompem e

os taquizoítas são liberados para invadir células vizinhas. Por via hematogênica e linfática eles chegam a praticamente todos os órgãos, onde na fase crônica da infecção tendem a formar cistos teciduais (DUBEY, 1998a).

### **3.1.5 Formas de Transmissão**

De maneira geral, todos os hospedeiros, sejam os definitivos ou intermediários podem se infectar com *T. gondii* a partir da ingestão de carne crua ou mal passada com cistos teciduais albergando bradizoítas; através de alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados que frequentemente estão presentes no solo; pela via transplacentária, resultante da infecção primária materna durante a gestação (DUBEY, 2008; JONES e DUBEY, 2010; SCHLÜTER et al., 2014); e de forma menos frequente, através do leite materno, de vaca ou cabra (que podem conter taquizoítas durante uma infecção aguda), transfusões de sangue, transplante de tecidos e órgãos e acidentes laboratoriais (DUBEY e LAPPIN, 2006; BARBOSA et al., 2014).

Apesar do importante papel dos felídeos, em especial o gato doméstico, no ciclo de *T. gondii*, onde atuam como disseminadores de oocistos no ambiente, a transmissão da toxoplasmose para seres humanos pelo ato de tocar ou acariciar um gato clinicamente saudável é mínima ou inexistente diante dos hábitos naturais de limpeza do mesmo, que impede que a deposição de material fecal em sua pelagem (GALVÃO, 2014).

### **3.1.6 Aspectos Epidemiológicos**

*T. gondii* tem caráter ubíquo e pode infectar praticamente todos os vertebrados homeotérmicos, inclusive animais marinhos. Estima-se que grande parte da população mundial já tenha tido contato com este parasito (DUBEY, 1996; SCHLÜTER, 2014). A prevalência sorológica desta infecção, no entanto, é bastante variável nos mais diferentes países, com valores em torno de 10 a 80%. Esta variação está diretamente ligada às condições climáticas, hábitos culturais e de higiene, bem como a fatores socioeconômicos, como índices de saneamento básico (JONES e DUBEY, 2014). Além disso, Remington et al. (1995) e Schlüter et al. (2014) afirmam que a soroprevalência tende a aumentar com a faixa etária da população, tendo em vista um aumento da probabilidade de contato com o parasito ao longo do tempo.

Em climas quentes e áreas com baixa altitude, bem como em locais com maior umidade a prevalência da infecção tende a ser maior, possivelmente pelo fato destas condições

favorecerem a esporulação e sobrevivência de oocistos no ambiente (TENTER et al., 2000; JONES e DUBEY, 2014).

Estudos sobre fatores de risco para a infecção por *T. gondii* indicam que o consumo de carne de porco e de ruminantes, como o carneiro, pode contribuir de forma significativa para a infecção humana (SCHLÜTER, 2014). Além disso, hábitos culturais de comer carne crua ou mal passada, relacionados a padrões de vida mais elevados, também vem apresentar papel importante na transmissão da toxoplasmose. Estas observações podem explicar o fato de uma alta soroprevalência de *T. gondii* na França. Em países em desenvolvimento, devido ao risco da presença de outros parasitos, como *Taenia solium*, a carne de porco tende a ser consumida bem passada, não oferecendo risco para a população (JONES e DUBEY, 2014). A carne bovina não tem sido reportada como um grande fator de risco, pois cistos teciduais raramente são encontrados neste alimento (TENTER et al., 2000).

Apesar de não se conhecer a proporção de infecção humana por *T. gondii* causada pela ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos teciduais e a porcentagem de casos decorrentes da presença de oocistos nas mãos, em vegetais não lavados ou na água, acredita-se que em lugares que existem muitos gatos, mesmo os domiciliados, como em países da América Latina, os oocistos sejam a principal fonte de infecção. No Brasil, por exemplo, a ingestão de água contaminada com oocistos já foi associada a surtos de toxoplasmose, uma vez que este é resistente à inativação por cloro, e que apenas com uma filtração especial é capaz de retirá-los da água (JONES e DUBEY, 2010, 2014; MOURA et al., 2006).

Dubey et al. (2012), ao revisar trabalhos sobre a soroprevalência da toxoplasmose no Brasil, afirmam que o risco de mulheres não infectadas adquirir a doença durante a gravidez seja muito alto devido ao ambiente ser altamente contaminado com oocistos, e estimam que cerca de 50 a 80% das mulheres em idade fértil tenha anticorpos para *T. gondii*.

Esta grande contaminação do solo do Brasil com oocistos de *T. gondii* vem sendo confirmada em diversos estudos com galinhas de livre criação realizados no país. Há relatos de números altos de soroprevalência nestes animais, que se alimentam diretamente do solo e funcionam como indicadores de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*. Nesse sentido, estes estudos vem contribuindo fortemente para o conhecimento sobre a toxoplasmose no Brasil (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2003; BELTRAME et al., 2012; HOLSBACK et al., 2012).

### 3.1.7 Toxoplasmose em humanos

Em pacientes imunocompetentes, sejam adultos ou crianças, a toxoplasmose primária geralmente é assintomática. Entretanto, algumas pessoas podem desenvolver febre, mialgia, linfadenopatia, principalmente nos linfonodos cervicais e occipitais, e em casos mais raros miocardite, pneumonia, encefalite e hepatite. Tanto infecções adquiridas após o nascimento quanto as congênitas podem ocasionar a toxoplasmose ocular, que é reconhecida como a principal causa de infecção na retina no mundo, e tem como lesão mais comum uma retinocoroidite necrosante, que pode vir acompanhada de iridociclite, glaucoma e/ou catarata. Apesar de existir tratamento para a toxoplasmose ocular, sua cura definitiva não é possível diante da inexistência de medicamentos eficientes na eliminação dos cistos teciduais presentes na retina do paciente, o que pode levar à infecções recorrentes (DUBEY et al., 2012; SCHLÜTER et al., 2014; BICHARA et al., 2014).

A toxoplasmose tem um desenvolvimento mais severo em indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes com AIDS, que desenvolvem principalmente um quadro com encefalite e alterações neurológicas que podem levar à morte. Na maioria dos casos, nestes pacientes a doença surge a partir da reativação de cistos teciduais existentes no cérebro ocasionada pela baixa imunidade instalada. Schlüter et al. (2014) e Galvão et al. (2014) citam ainda o risco em pacientes que fazem uso prolongado de citostáticos e corticosteroides, além daqueles com linfomas, leucemias, e que passam por transplantes de órgãos, em especial de coração, que podem ter cistos teciduais de *T. gondii* albergados, que se reativam no organismo do paciente transplantado. É válido ressaltar que antes do surgimento da epidemia da AIDS na década de 80, casos de encefalite ocasionada por Toxoplasmose eram raros e limitados a pacientes transplantados (DUBEY, 2008), e que com o avanço dos tratamentos efetivos contra a atividade viral em pacientes HIV positivo o número de casos de neurotoxoplasmose tem reduzido significativamente (TENTER et al., 2000; DUBEY et al., 2012).

Uma das formas mais frequentes de toxoplasmose em humanos, a congênita, é aquela onde a transmissão da doença ocorre da mãe para o filho por via hematogênica. O risco de uma gestante com infecção aguda (primo-infecção) transmitir a doença para o feto, bem como o risco de comprometimento do mesmo, são variáveis e dependem principalmente da idade gestacional que ocorreu a infecção (BICHARA et al., 2014).

É incomum infecções fetais quando a mãe adquire a infecção no primeiro trimestre da gestação, porém quando estas ocorrem, a criança geralmente apresenta comprometimento importante. Quando a mãe passa por uma infecção no último trimestre gestacional, no entanto,

o índice de infecções fetais é muito elevado mas a criança geralmente nasce assintomática. Esta situação se deve ao fato de que no início da gestação a circulação sanguínea entre a mãe e o feto ainda não está completamente formada, e isto dificulta a propagação da infecção, porém, como os principais órgãos e sistemas do feto ainda estão em formação, a infecção quando ocorre tende a ser severa. Situação inversa ocorre no terço final da gestação, quando a circulação sanguínea entre a mãe e a criança está completamente formada, favorecendo a disseminação do *T. gondii*, entretanto, como a criança já está bem desenvolvida, a infecção é mais branda (BICHARA et al., 2014).

Ao nascer, uma pequena parcela dos recém nascidos com toxoplasmose congênita apresenta anormalidades no exame físico, com um quadro clínico generalizado de hepatomegalia, esplenomegalia, icterícia, lesões purpúricas e síndrome nefrótica, geralmente associado a alterações neurológicas e oculares típicas. Cerca de dois terços dos bebês com anormalidades tendem a apresentar microcefalia ou hidrocefalia, convulsões, microftalmia e catarata. Entre os recém-nascidos que não apresentam anormalidades no exame físico ao nascer, a maior mostra alguma manifestação clínica durante investigações mais completas, como retinocoroidite, opacidades vítreas, atrofia do nervo óptico, dentre outras. Pacientes sintomáticos ao nascer não submetidos a tratamento geralmente desenvolvem retardo mental e cegueira. Surdez também tem sido relatada em casos sem tratamento (DUBEY, 1996; BICHARA et al., 2014; GALVÃO et al., 2014).

### **3.1.8 Toxoplasmose em animais**

O *T. gondii* tem capacidade de infectar as mais diferentes espécies entre mamíferos e aves. Assim como nos seres humanos, grande parte das infecções animais são assintomáticas, entretanto, algumas espécies são mais susceptíveis e podem apresentar uma doença mais severa, como no caso de caprinos e ovinos, que normalmente tem perdas reprodutivas com morte embrionária e reabsorção, mumificação de fetos e abortos. Há relatos também de doença causando morte em suínos jovens e aves (DUBEY, 2002; DUBEY, 2004). Apesar das perdas econômicas e da importância veterinária da doença, a principal atenção nas infecções de *T. gondii* em animais está na questão zoonótica, pelo fato deles, como hospedeiros intermediários albergando cistos teciduais, servirem como porta de infecção para o homem ou felídeos, através do consumo de carne crua ou mal passada.

Entre as aves domésticas que podem ser acometidas pela toxoplasmose tem-se a galinha, o peru, o pato e o canário, o que confirma a capacidade do *T. gondii* em infectar animais

pertencentes a grupos distintos (HOLSBACK et al., 2012). Estudos desenvolvidos em diferentes países tem demonstrado alta prevalência e obtido isolados viáveis de *T. gondii* em galinhas de criação livre (Quadro 1), que apesar disso, se mostram resistentes ao parasito e raramente desenvolvem a doença clínica. O grande interesse em pesquisar *T. gondii* nestes animais se deve ao fato dos mesmos serem considerados um dos melhores indicadores de contaminação do ambiente para este parasito, pois tem o hábito de “ciscar”, se alimentando diretamente do solo e assim, se contaminam acidentalmente com oocistos de *T. gondii* (DUBEY, 2010). Holsback et al. (2012) enfatizam ainda que galinhas de criação livre podem se alimentar de restos de comida e predação pequenos roedores, situações nas quais podem ingerir também cistos teciduais infectados.

**Quadro 1.** Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* observada em galinhas de criação livre em diferentes países.

PAÍS	Nº DE ANIMAIS POSITIVOS / TOTAL DE EXAMINADOS	SOROPREVALÊNCIA	MÉTODO	REFERÊNCIA
Argentina	25/61	40,98%	MAT <sup>1</sup>	Dubey et al. (2005a)
Austria	302/830	36,38%	MAT <sup>1</sup>	Dubey et al. (2005b)
Colombia	32/72	44,44%	MAT <sup>1</sup>	Dubey et al. (2005c)
Chile	47/85	55,29%	MAT <sup>1</sup>	Dubey et al. (2006a)
Brasil (RJ)	151/316	47,8%	RIFI <sup>2</sup>	Bonna et al. (2006)
Brasil (MG)	15/28	53,57%	RIFI <sup>2</sup>	Brandão et al. (2006)
Brasil (Nordeste)	81/152	53,29%	MAT <sup>1</sup>	Oliveira et al. (2009)
Brasil (MA)	14/20	70,00%	MAT <sup>1</sup>	Oliveira et al. (2009)
Brasil (ES)	206/510 198/510	40,39% 38,82%	HAI <sup>3</sup> MAT <sup>2</sup>	Beltrame et al. (2012)
China	21/100	21,00%	ELISA <sup>4</sup>	Zhao et al. (2012)
Brasil (RN)	30/43	69,77%	ELISA <sup>4</sup>	Clementino Andrade et al. (2013)

<sup>1</sup>Teste de Aglutinação Modificado; <sup>2</sup> Reação de Imunofluorescência Indireta; <sup>3</sup>Hemaglutinação Indireta; <sup>4</sup>“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”.

Dubey (2010), lembra ainda que o fornecimento de tecidos de galinhas de criação livre contaminados com cistos de *T. gondii* podem ser uma importante fonte de infecção para gatos e outros animais. A infecção em humanos através do consumo de tecidos de galinhas com cistos de *T. gondii* é menos provável, pois normalmente o consumo deste tipo de alimento é realizado após efetivo cozimento, que leva à inativação dos cistos. Ainda assim, Casartelli-Alves et al. (2012) menciona o consumo em especial de coração mal passado, um dos tecidos com maior presença de cistos de *T. gondii* em aves infectadas, como um importante fator de risco nas infecções humanas e de outras espécies.

Contrastando com as criações de galinha em pequena escala, onde os animais são criados soltos e permanecem por um grande período em um mesmo ambiente, as criações de frango em escala industrial não tem grande importância na transmissão da toxoplasmose, devido principalmente ao curto período de criação e do confinamento dos animais, que impede o contato das aves com felídeos e conseqüentemente com os oocistos do ambiente (SANTOS, 2012).

### 3.1.9 Métodos Diagnósticos

Para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* diferentes métodos vêm sendo aplicados, desde aqueles diretos, como exames parasitológicos, isolamento, imunohistoquímica e técnicas moleculares, a métodos sorológicos, que por serem menos dispendiosos e mais rápidos são bastante difundidos na rotina e levantamentos epidemiológicos da toxoplasmose, como o teste da aglutinação modificado (MAT), o “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). O teste de corante Sabin Feldman é altamente sensível e específico para toxoplasmose humana, mas não tem demonstrado bons resultados em animais (DUBEY e LAPIN, 2006; DUBEY, 2010).

Uma técnica comumente utilizada para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* nas diferentes espécies animais é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (COLA et al., 2010), que segundo Casartelli-Alves et al. (2014) é um método pouco específico, mas com boa sensibilidade no diagnóstico de *T. gondii* em galinhas.

Métodos moleculares como a Reação em Cadeira pela Polimerase (PCR) tem se mostrado bastante sensíveis na detecção de infecções por *T. gondii*, entretanto, a positividade no exame não pode comprovar se o DNA amplificado deriva de parasitos viáveis ou simplesmente de fragmentos do mesmo. Por este motivo, a utilização de bioensaio em animais susceptíveis, como camundongos, visando o isolamento do parasito, consorciada a métodos moleculares tem se mostrado eficiente em pesquisas (HOLSBACK et al., 2012).

Dentre as técnicas moleculares, merecem destaque a eletroforese isoenzimática, a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), os marcadores microssatélites e a PCR-RFLP. Sendo esta última, uma das técnicas mais utilizadas na caracterização genotípica de *T. gondii*, mesmo quando comparada a métodos de maior resolução como os marcadores microssatélites (RAGOZO, 2007).

A PCR-RFLP consiste na clivagem do DNA através de enzimas de restrição capazes de reconhecer sequências pequenas e específicas (quatro a oito bases), onde a mudança de uma

única base nesta sequência já impede a clivagem da molécula. Quando se examina a mesma região de um cromossomo de indivíduos relacionados, mas não idênticos, observa-se que a sequência de DNA é semelhante, mas não é exatamente igual. Dessa forma, os sítios de restrição presentes em um, podem estar faltando no outro, o que gerará fragmentos de comprimentos diferentes, que ao serem separados em um gel, por eletroforese, geram bandas de pesos moleculares distintos (CLARK e RUSSEL, 1997 apud PENA, 2004).

### **3.1.10 Caracterização Molecular e populacional de *T. gondii***

*T. gondii* apresenta um genoma nuclear de aproximadamente 87 Mb, complementado por um genoma plastídeo (DNA circular extracromossomal) de 35Kb e um genoma mitocondrial de 6Kb (AJIOKA et al., 2001). O primeiro mapa genômico deste protozoário foi construído por Sibley e Boothroyd (1992) e contava com 11 cromossomos. Posteriormente, Khan et al. (2005a) através de recombinações de cepas, definiram um novo mapa com a segregação de 250 marcadores genéticos em 14 cromossomos designados por algarismos romanos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI e XII), com tamanhos que variam de 1,8 Mb a > 10 Mb.

Há alguns anos a estrutura genética populacional de *T. gondii* foi definida como sendo clonal, baseada em um estudo realizado por Howe e Sibley (1995) onde isolados dos diferentes continentes foram analisados em seis fragmentos de DNA (SAG1, SAG2, ROP1, 850, L328 e 62). Este trabalho revelou três linhagens clonais predominantes: uma virulenta (tipo I) e duas não virulentas (tipo II e tipo III), onde cepas tipo II estavam associadas à toxoplasmose em humanos e as tipo III em animais.

O fato de ser haploide, bem como a não obrigatoriedade da reprodução sexuada para a obtenção de sucesso de sua disseminação na natureza, se mantendo apenas pela transmissão oral de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários, possibilitaria a existência de uma estrutura populacional predominantemente clonal. Além do fato de que raramente os felídeos se infectam simultaneamente com múltiplas cepas, o que limitaria muito as trocas genéticas (BOOTHROYD e GRIGG, 2002).

Partindo da premissa que *T. gondii* possuía uma população clonal, um sistema de tipificação que utilizava o gene SAG-2, localizado no cromossomo VIII do parasito, como marcador único foi descrito por Howe et al. (1997). Este sistema era capaz de identificar as três linhagens clonais típicas do parasito, e foi amplamente utilizado durante vários anos (DUBEY et al., 2003; DUBEY et al., 2005a; DUBEY et al., 2005b; DUBEY et al., 2005c; DUBEY et al.,

2005d). Isolados de *T. gondii*, sobretudo dos Estados Unidos e Europa, foram agrupados dentro dos três grupos clonais distintos (tipos I, II, III) e eram consideradas como tendo uma baixa variabilidade genética (HOWE e SIBLEY, 1995; ZHAO et al., 2012).

Entretanto, a genotipagem de cepas de *T. gondii* baseada em apenas um ou dois marcadores apresenta limitações, uma vez que impossibilita a identificação de genótipos recombinantes ou atípicos (FERREIRA e VITOR, 2014). Fato este comprovado com o advento de sistemas de genotipagem multilocais, que corroboraram com a identificação de novos genótipos de *T. gondii* em diferentes espécies animais e no homem, em especial no Brasil, onde esta espécie demonstra ter uma maior variabilidade genética quando comparada às cepas isoladas nos Estados Unidos e Europa (PENA et al., 2008; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013; CARNEIRO et al., 2013; PENA et al., 2013).

Pena et al. (2008) analisando 125 isolados brasileiros obtidos de galinhas, cães e gatos utilizando 12 marcadores de PCR-RFLP (SAG1, SAG2 (5'3'SAG2), alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3) encontraram 48 genótipos distintos onde 4 deles foram considerados como linhagens clonais comuns no Brasil, sendo denominadas tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV. Os autores afirmaram ainda que os isolados do tipo BrI são altamente virulentos, BrIII não são virulentos e os tipos BrII e BrIV possuem virulência intermediária para camundongos. Entretanto, Dubey e Su (2009) constataram que a maioria dos isolados encontrados no Brasil não são clonais, o que sugere recombinação e transmissão eficiente de oocistos e confirma que *T. gondii* é muito mais diverso geneticamente do que se pensava antes. Para Grigg e Sundar (2009) a explicação mais simples para a evolução deste tipo de estrutura genética populacional é aquele que conta com a flexibilidade do complexo ciclo de vida deste parasito.

Ferreira e Vitor (2014) enfatizam que o conhecimento da estrutura populacional de *T. gondii* é de grande importância para a saúde pública e clínica médica, uma vez que a correlação entre o genótipo do parasito e a manifestação da doença poderá fornecer marcadores que definam o prognóstico da toxoplasmose, levando ao tratamento apropriado de pacientes acometidos com a infecção.

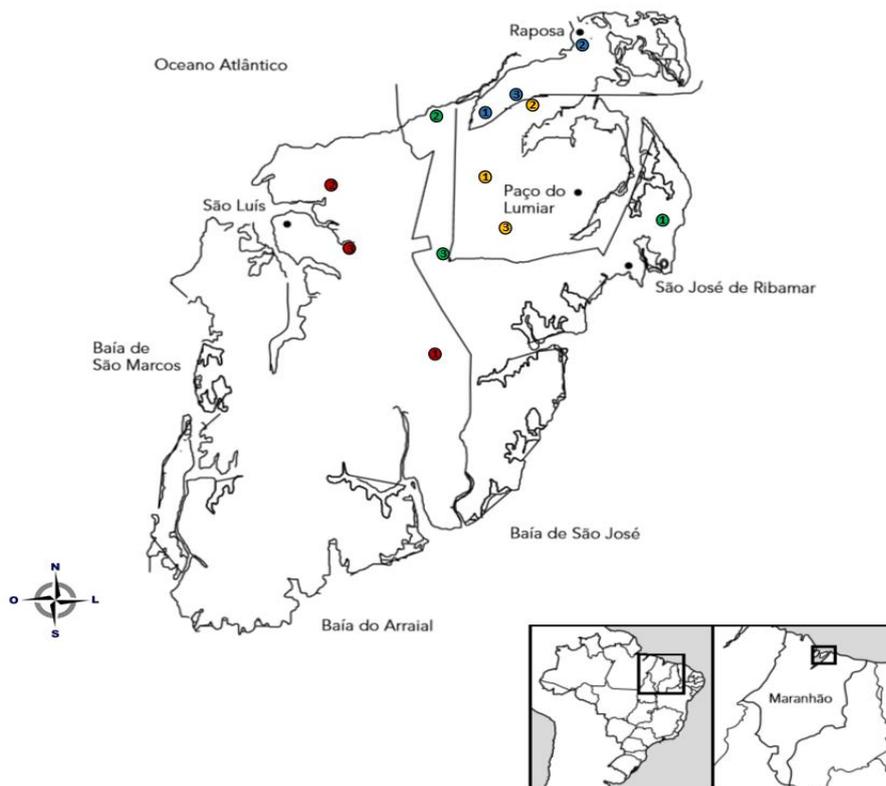
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do Experimento

O procedimento experimental foi realizado no laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água e no laboratório de Fisiologia pertencentes ao Centro de Ciências Agrárias no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, em parceria com o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

### 4.2 Obtenção das aves

Para o experimento, foram adquiridas diretamente dos produtores, 15 galinhas (*Gallus domesticus*) de criação livre de cada município pertencente à ilha de São Luís, estado do Maranhão: São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa, totalizando 60 aves. Em cada município foram realizadas 3 coletas em criações distintas, com a obtenção de 5 aves por coleta (APÊNDICE A) (Figura 2). O intervalo médio entre coletas foi de 3 meses.



**Figura 2.** Localização dos municípios da Ilha de São Luís – MA e seus respectivos pontos de obtenção de aves: Paço do Lumiar (amarelo), São José de Ribamar (verde), São Luís (vermelho) e Raposa (azul). Os números 1, 2 e 3 indicam a ordem das coletas realizadas.

A seleção dos locais para obtenção das aves foi baseada na amostragem não probabilística por conveniência, tendo em vista a ausência de cadastros das criações na região. Neste sentido, as propriedades foram escolhidas a partir da seleção prévia do pesquisador, obedecendo a critérios como acessibilidade e o conhecimento de possíveis proprietários ou de pessoas que pudessem facilitar esse contato, visando mitigar possíveis riscos relacionados a problemas técnicos.

A maioria dos proprietários não sabia precisar a idade exata das aves, apesar disso, a partir de informações dos mesmos, apenas animais com idade superior a 6 meses foram adquiridos para a pesquisa.

Após a obtenção das aves, as mesmas foram alojadas na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão, Campus São Luís, mantidas confinadas em gaiolas individuais com fornecimento diário de ração e água até os procedimentos de coleta de sangue e necrópsia.

O uso dos animais neste trabalho foi solicitado ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA-UEMA), sob o protocolo nº 015/2013.

### **4.3 Obtenção e Processamento das Amostras de Sangue**

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da veia braquial das aves (aproximadamente 1 mL/ave), acondicionadas em tubos sem anti-coagulante e mantidas à temperatura ambiente até retração do coágulo. Em seguida, as mesmas foram transportadas para o Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual do Maranhão, para posterior processamento. As amostras de soro foram obtidas por meio de centrifugação a 2500g por 15 minutos, aliquotadas em microtubos tipo eppendorfs e armazenadas a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

### **4.4 Teste Sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii***

Os soros das galinhas foram submetidos a técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de acordo com Carmago (1974), com um ponto de corte de 1:16 (BRANDÃO et al., 2006).

As amostras foram diluídas em placa de 96 poços utilizando-se solução tampão PBS (NaCl 0,731M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,105M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,018M), distribuídas em lâminas sensibilizadas para *T.gondii* e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após este

período, as lâminas foram lavadas três vezes em solução PBS (10 minutos por cada lavagem). Após a secagem das lâminas, adicionou-se o conjugado anti-IgG de galinha (Sigma<sup>®</sup>) marcado com isotiocianato de fluoresceína, previamente diluído em solução de azul de Evans 4mg%. As lâminas foram incubadas novamente por 30 minutos à 37°C e lavadas três vezes por 10 minutos em solução PBS. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula, sendo a leitura realizada em microscópio de fluorescência.

Em todas as reações foram usados controles positivo e negativo, previamente conhecidos e cedidos pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - USP, assim como as lâminas utilizadas nos testes.

As amostras foram consideradas positivas quando os taquizoítas demonstraram completa marcação fluorescente em toda a sua membrana externa, e esta reação foi visualizada em mais de 50% do campo de visualização da lâmina. Todas as amostras positivas foram testadas em diluições seriadas a partir de 1:16 até chegar ao título máximo da reação.

#### **4.5 Digestão Péptica dos Tecidos**

As aves soropositivas na RIFI foram eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical, de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (CFMV, 2012). Em seguida, foram colhidos o coração e o cérebro de cada galinha, os quais foram acondicionados em sacos do tipo “Ziploc” previamente identificados e conservados sob refrigeração (2 a 8°C) por no máximo 4 dias, para posterior realização do bioensaio em camundongos, segundo o protocolo proposto por Dubey (1998b).

Primeiramente, o tecido cardíaco foi cortado em pequenos pedaços e removidos o tecido conectivo e a gordura do mesmo. Em seguida, o coração e o cérebro de cada animal foram pesados e, posteriormente homogeneizados com cinco volumes de solução salina a 0,85% com auxílio de homogenizadores de uso doméstico ou cadinhos e pistilos. Após a homogeneização, adicionava-se ao material uma solução de pepsina ácida, pH 1,1-1,2 (pepsina 2,6g, NaCl 5,0g, HCl 7,0mL, água 500mL), recém preparada e aquecida em banho-maria a 37°C. A mistura obtida foi incubada a 37°C, sob agitação durante uma hora.

Após este período, a suspensão foi filtrada em gaze e transferida para tubos falcon de 50mL, os quais foram levados à centrifugação a 1200g por 10 minutos. Desprezando-se o sobrenadante, o sedimento de cada tubo foi neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH~8,3, recém-preparado. Em seguida, o material foi homogeneizado e transferido

para um único tubo falcon de 50mL, que tinha seu volume completado com solução salina e levado à centrifugação a 1.200g por 10 minutos. O sobrenadante mais uma vez foi desprezado, e o sedimento homogeneizado com salina (v/v) contendo 2000U de penicilina e 200g de estreptomicina por mililitro. A mistura obtida foi inoculada em um grupo de camundongos.

Para evitar contaminações cruzadas, todo o material não descartável utilizado (vidraria, material cirúrgico) em todas as fases do experimento, foi submetido à fervura com água, lavagem com detergente neutro, enxágue em água corrente, imersão em HCl 0,1N por dois minutos, enxágue em água destilada (PENA, 2004), e autoclavado à 121°C por 15 minutos.

#### **4.6 Bioensaio em camundongos**

Nesta etapa foram utilizados camundongos albinos Swiss, fêmeas ou machos, com idade aproximada de dois meses, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Maranhão - MA.

##### **4.6.1 Delineamento Experimental**

O material (cérebro e coração) de cada galinha soropositiva, digerido pelo método descrito por Dubey (1998b), foi inoculado em um grupo específico de camundongos. Cada grupo era constituído por cinco camundongos, alojados em uma mesma caixa. Cada camundongo foi inoculado subcutaneamente com 1,0 mL da amostra digerida, marcado em locais diferentes do corpo com ácido pícrico [1° - cabeça (Cab); 2° - cauda (Cad); 3° - dorso (Dor); 4° - barriga (Bar); 5° - pata (Pat)], e observado duas vezes ao dia durante 30 dias. Após este período, os mesmos foram observados apenas uma vez ao dia. Todas as caixas foram mantidas com água e comida a disposição, e higienizadas a cada dois dias.

Os animais que vieram a óbito foram examinados para pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito no item abaixo. Camundongos que sobreviveram até seis semanas pós-inoculação (P.I.) foram examinados sorologicamente para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, através da RIFI também de acordo com Carmago (1974) e com um ponto de corte de 1:16, utilizando-se, entretanto, o conjugado anti-IgG de camundongo (Rhea Biotech®).

Os camundongos soronegativos foram sacrificados logo após o resultado da sorologia, sendo submetidos à pesquisa de *T. gondii* no tecido cerebral. Animais soropositivos

permaneceram no experimento até 6 semanas P.I., quando só então foram sacrificados e a pesquisa de *T. gondii* no cérebro realizada.

O sacrifício dos camundongos foi realizado através da associação de 100mg/Kg de quetamina a 10% com 10mg/Kg de xilasina a 2%, via intraperitoneal, seguida de deslocamento cervical, de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (CFMV, 2012).

#### 4.6.1.1 Pesquisa de *T. gondii*

Todos os camundongos usados no bioensaio foram examinados nos tecidos para a pesquisa de *T. gondii*, como descrito previamente (DUBEY e BEATTIE, 1988). Impressões de pulmão e fragmentos de cérebro dos animais que vierem a óbito foram examinados sob microscopia de luz, entre lâmina e lamínula, para pesquisa de estágios de *T. gondii* (taquizoítos e/ou cistos). Para tanto, cortou-se um fragmento de pulmão, o excesso de sangue na superfície de corte foi removido e essa superfície foi aplicada sobre uma lâmina com uma gota de solução salina a 0,85%, cobrindo-se então com uma lamínula. Fragmentos de cérebro de 3,0-5,0mm<sup>2</sup> foram comprimidos entre lâmina e lamínula e examinados para pesquisa de cistos. O cérebro dos animais soropositivos e soronegativos foram examinados da maneira descrita acima. Considerando-se como infectados por *T. gondii*, os camundongos nos quais estágios do parasito foram encontrados em seus tecidos.

### 4.7 Análise Genotípica

#### 4.7.1 Amostras Positivas (Isolados)

O pulmão e/ou cérebro de cada camundongo positivo para *T. gondii* foi macerado separadamente utilizando-se gral e pistilo. Acrescentando-se, depois, 1,5 mL de salina estéril. A suspensão obtida foi colocada em microtubo de 2,0 mL e armazenada em freezer a -70°C até o processamento para extração do DNA.

#### 4.7.2 Extração do DNA

Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 8.000g por 3 minutos e parte do sobrenadante foi eliminado restando aproximadamente 1 mL de cada amostra. Deste volume, foi retirado 200µL, o qual foi transferido para um microtubo de 1,5mL. As amostras

foram então lavadas com tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) e centrifugadas por 5 minutos a 6.000g. O sobrenadante foi descartado, ficando-se apenas com o pellet das amostras.

Para a extração do DNA foi utilizado o kit “*Dneasy*<sup>®</sup> *Blood & Tissue*” da Qiagen<sup>®</sup>, protocolo “*spin-column*” para tecidos animais. De acordo com instruções do fabricante, foi adicionado às amostras 180µL de tampão ATL e 20µL de Proteinase K. Depois de uma homogeneização em vórtex por 10 segundos, as amostras foram então submetidas à uma fase de lise por meio de incubação em termobloco à 56°C durante a noite.

Após a lise completa dos fragmentos contidos nas amostras, uma nova homogeneização em vórtex foi realizada por 15 segundos seguida de um “*spin*” realizado em centrífuga de microtubos. Em seguida, 200µL de tampão AL foi adicionado às amostras, as quais passaram por novo vórtex de 5 segundos e “*spin*”, e foram acrescidas de 200 µL de etanol a 96% seguido por vórtex de 5 segundos e “*spin*”. A mistura obtida de cada amostra foi então pipetada e transferida para colunas *Dneasy*. Estas foram então centrifugadas por 1 minuto a 8.000g, e em seguida, a parte inferior das mesmas foram descartadas e uma novas colunas foram inseridas nos locais. Adicionou-se então 500µL de tampão AW1 às amostras, e uma nova centrifugação a 8.000g durante 1 minuto foi realizada, substituindo-se, em seguida, mais uma vez a parte inferior das colunas. Neste momento, 500µL de tampão AW2 foram adicionados às amostras e as mesmas foram centrifugadas por 3 minutos a 20.000g. A parte inferior das colunas foram descartadas e substituídas desta vez por microtubos de 1,5mL previamente identificados. Em sequência, adicionou-se 200µL de tampão AE às amostras nas colunas e aguardou-se 1 minuto em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas à 8.000g por 1 minuto para eluição, e a parte superior das colunas foram descartadas, tendo em vista que o DNA extraído ficou depositado no microtubos, os quais foram armazenados à -20°C até a realização dos procedimentos moleculares descritos abaixo.

#### **4.7.4 PCR-RFLP Multilocal**

A partir do DNA extraído dos isolados de *T. gondii* obtidos no bioensaio, realizou-se a PCR-RFLP utilizando-se 12 marcadores distintos: SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, APICO (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007) e CS3 (PENA et al., 2008). Como controles, foram utilizadas amostras clonais (tipo I-GT1, tipo II-PTG, tipo III-CTG) e de referência (TgCgCa1, MAS e TgCatBr5). Detalhes sobre os primers e enzimas utilizados estão expostos no Quadro 2.

**Quadro 2.** Marcadores moleculares, oligonucleotídeos (*primers*) e enzimas de restrição utilizados na PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de isolados de *T. gondii* em galinhas de criação livre nos municípios da ilha de São Luís, MA.

Marcador	Cromossomo	Primers externos	Primers Internos	Enzimas de Restrição, temperatura, tempo de incubação, %gel	Referência
SAG1	VIII	F:GTTCTAACCACGCACCCTGAG R:AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F:CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R:GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	<i>Sau96I</i> + <i>HaeII</i> , 37°C, 60' gel 2,5%	Grigg et al. (2001); Dubey et al. (2006a)
5'SAG2	VIII	F:GCTACCTCGAACAGGAACAC R:GCATCAACAGTCTTCGTTGC	F:GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R:GCAAGAGCGAACTTGAACAC	<i>MboI</i> , 37°C, 60' gel 2,5%	Howe et al. (1997); Su et al. (2006)
3'SAG2	VIII	F:TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R:TCAAAGCGTGCATTATCGA	F:ATTCTCATGCCTCCGCTTC R:AACGTTTCACGAAGGCACAC	<i>HhaI</i> , 37°C, 60' gel 2,5%	Howe et al. (1997);
SAG3	XII	F:CAACTCTCACCATTCCACCC R:GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F:TCTTGTGCGGGTGTCACTCA R:CACAAGGAGACCGAGAAGGA	<i>NciI</i> , 37°C, 60' gel 2,5%	Grigg et al., (2001); Su et al. (2006)
Alt.SAG2	VIII	F:GGAACGCGAACAATGAGTTT R:GCACTGTTGTCCAGGGTTT	F:ACCCATCTGCGAAGAAAACG R:ATTTGACCGAGCGGGAGCAC	<i>HinfI</i> + <i>TaqI</i> , 37°C 30', 65°C 30', gel 2,5%	Lehmann et al.(2000); Su et al. (2006)
BTUB	IX	F:TCCAAAATGAGAGAAATCGT R:AAATTGAAATGACGGAAGAA	F:GAGGTCATCTCGGACGAACA R:TTGTAGGAACACCCGGACGC	<i>BsiEI</i> + <i>TaqI</i> , 60°C, 60' gel 2,5%	Khan et al (2005b); Su et al. (2006); Dubey et al. (2006a)
GRA6	X	F:ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R:GCACCTTCGCTTGTGGTT	F:TTTCCGAGCAGGTGACCT R:TCGCCGAAGAGTTGACATAG	<i>Mse I</i> , 37°C, 60' gel 2,5%	Fazeli et al. (2000); Su et al. (2006)
C22-8	Ib	F:TGATGCATCCATGCGTTTAT R:CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F:TCTCTCTACGTGGACGCC R:AGGTGCTTGGATATTCGC	<i>BsmAI</i> + <i>MboII</i> , 37°C 30', 55°C 30', gel 2,5%	Khan et al (2005b); Su et al. (2006)
C29-2	III	F:ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R:AGGGTCTCTTTCGCATACAT	F:AGTTCTGCAGAGTGTGCG R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC	<i>HpyCH4IV</i> + <i>RsaI</i> , 37°C, 60' gel 2,0%	Khan et al (2005b); Su et al. (2006)
L358	V	F:TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R:GCAATTCCTCGAAGACAGG	F:AGGAGGCGTAGCGCAAGT R:CCCTCTGGCTGCAGTGCT	<i>HaeIII</i> + <i>NlaIII</i> , 37°C, 60' gel 2,5%	Khan et al (2005b); Su et al. (2006)
PK1	VI	F:GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R:AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F:CGCAAAGGGAGACAATCAGT R:TCATCGCTGAATCTCATTGC	<i>AvaI</i> + <i>RsaI</i> 37°C, 60' gel 2,5%	Khan et al (2005b); Su et al. (2006)
Apico	Plasmídio	F:TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R:AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F:TGCAAATTCATTGAATTCTCAGTT R:GGGATTCGAACCCCTTGATA	<i>AflIII</i> + <i>DdeI</i> , 37°C, 60' gel 3,0%	Su et al. (2006)
CS3	VIIa	F:GTGTATCTCCGAGGGGGTCT R:TGTGACTTCTTCGCATCGAC	F:AGCGGATTTCCAACACTGTC R:CTGCTGCATTACAAACTCC	<i>NIaIII</i> + <i>MboI</i> , 37°C, 60' gel 2,5%	Pena et al. (2008)

Primeiramente, as sequências de DNA-alvo foram amplificadas em uma única multiplex PCR utilizando-se os primers externos de todos os marcadores citados anteriormente. O produto desta etapa foi então diluído 1:1 em água ultrapura. Na sequência, foram realizadas *nested*-PCR para os marcadores individualmente, utilizando-se os primers internos.

Para a multiplex PCR, em uma reação de 25µL, foi utilizada a seguinte sequência de reagentes: 17,6µL de água ultrapura, 2,5µL de 10× tampão de reação (Mg<sup>-</sup>), 2,0µL de dNTPs (2.5mM), 1,0µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,15µL de cada primer (25.0µM), 0,10µL de Platinum<sup>®</sup> Taq ADN polimerase (Invitrogen) (5U/µL) e 1,5µL de amostra. Na *nested*-PCR foi utilizada mistura semelhante, porém, com primers de 50.0µM, e 1,5µL do produto da multiplex PCR diluído.

A reação da multiplex PCR foi incubada a 95° C durante 4 min, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, hibridização a 55° C durante 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minuto. Enquanto que a reação da *nested*-PCR foi realizada a 95° C durante 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 1 minuto e 72° C durante 2 minutos.

Para revelar o padrão de RFLP de cada amostra, 3µL de cada produto da *nested*-PCR foi adicionado a 17µL de mix de digestão, contendo solução tampão (CSB 10x) e unidades específicas de cada enzima de restrição. As amostras foram incubadas nas temperaturas indicadas pelo fabricante como a ideal para cada enzima (Quadro 1). Finalizado os ciclos de incubação, as amostras foram submetidas à corrida em gel de agarose a 2,0-3,0%, contendo SYBR<sup>®</sup> green (Invitrogen), em cuba horizontal com solução tampão TBE a 0,5%, juntamente com um marcador de peso molecular, e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem.

Neste trabalho foram utilizados marcadores de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de base (pb) e um “low DNA Mass ladder” com as bandas de 100, 200, 400, 800, 1200 e 2000 pb.

Para caracterização genotípica, foram analisados os perfis de bandas encontrados na digestão e feita uma comparação com perfis de cepas de referência (SU e DUBEY, 2009) (Quadro3). Em seguida, os resultados obtidos foram comparados e classificados de acordo com os genótipos presente no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>) e publicações recentes.

**Quadro 3.** Perfis de PCR-RFLP Multilocal das amostras clonais Tipos I, II e III e amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controle neste estudo.

Ident.	Marcadores PCR-RFLP											
	SAG1	5'3'SAG2 <sup>1</sup>	alt.SAG2 <sup>2</sup>	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	C29-2	L358	PK1	apico	CS3
GT1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
PTG	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
CTG	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
TgCgCa1 (Cougar)	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II
MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II
TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II

(SU e DUBEY, 2009)

u-1 e u-2 são novos alelos, diferentes dos alelos clonais tipo I, II e III.

<sup>1</sup>Marcador SAG2 baseado na terminação 5' e 3' da sequência do gene (HOWE et al., 1997)

<sup>2</sup>Marcador SAG2 alterado, baseado na terminação 5' da sequência do gene (SU et al., 2006)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Sorologia das aves (RIFI)

A distribuição dos animais soropositivos, segundo o município de procedência e o sexo encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Frequência de aves (*Gallus domesticus*) soropositivas para anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo o sexo e o município de procedência na Ilha de São Luís – MA, 2015.

Município	Nº de aves examinadas	Aves soropositivas*			
		Número			%
		Machos	Fêmeas	Total	
Paço do Lumiar	15	1	6	7	46,7
Raposa	15	0	2	2	13,3
São José de Ribamar	15	1	3	4	26,7
São Luís	15	0	2	2	13,3
<b>TOTAL</b>	60	2 (40,00)	13 (23,64)	15	25,0

\* Título  $\geq$  1:16

Pelos dados apresentados na Tabela 1 verifica-se que do total de 60 aves (*Gallus domesticus*) examinadas, 15 (25,0%) foram positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, onde a soropositividade das fêmeas foi de 23,64% (13/55) e dos machos 40,00% (2/5).

Quanto aos resultados dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* encontrados (Tabela 2) estes variaram de 1:16 a 1:8192, sendo que 66,7% (10/15) dos soropositivos apresentaram títulos entre 1:64 e 1:1024.

**Tabela 2.** Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos pela Reação de Imunofluorescência (RIFI) em aves (*Gallus domesticus*) naturalmente infectadas na ilha de São Luís – MA, 2015.

<b>Título</b>	<b>Número de aves soropositivas</b>	<b>%</b>
1:16	2	13,33
1:32	2	13,33
1:64	2	13,33
1:128	3	20,00
1:256	2	13,33
1:1024	3	20,00
1:8192	1	06,68
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>100,00%</b>

### 5.2 Bioensaio em camundongos e isolamento de *T. gondii*

A partir das aves (*Gallus domesticus*) positivas na sorologia para *T. gondii* foram realizados 15 bioensaios, obtendo-se destes 5 isolados (TgCkBrMA1 a TgCkBrMA5), sendo 1 do município de Raposa, 2 do município de São José de Ribamar e 2 de Paço do Lumiar, conforme dados apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Número de bioensaios realizados e número de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos por município da ilha de São Luís – MA, 2015.

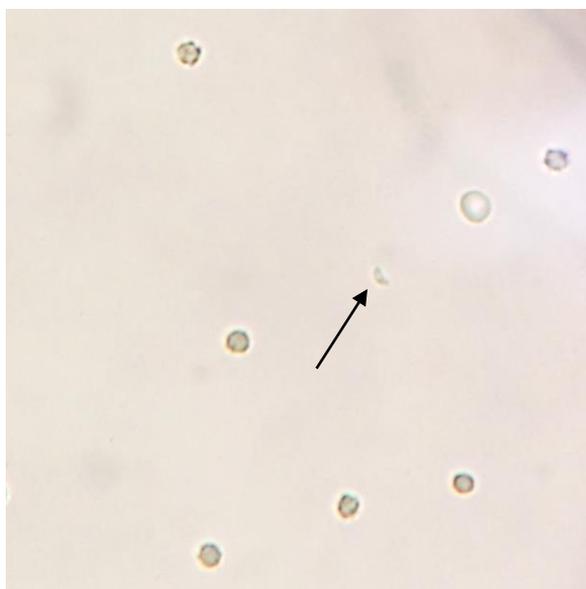
<b>Município</b>	<b>Número de bioensaios realizados</b>	<b>Número de isolados obtidos</b>
<b>Paço do Lumiar</b>	7	2
<b>Raposa</b>	2	1
<b>São José de Ribamar</b>	4	2
<b>São Luís</b>	2	0
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>5</b>

A relação entre o número de isolados obtidos e o título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* das aves podem ser visualizados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Relação entre o título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* das aves soropositivas, o número de bioensaios realizados e o número de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos, São Luís – MA, 2015.

Título	Número de bioensaios	Número de isolados (%)
1:16	2	0 (00,0%)
1:32	2	0 (00,0%)
1:64	2	0 (00,0%)
1:128	3	0 (00,0%)
1:256	2	1 (50,0%)
1:1024	3	3 (100,0%)
1:8192	1	1 (100,0%)
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>5</b>

Do total de 75 camundongos inoculados durante o bioensaio, 19 (25,3%) apresentaram infecção aguda por *T. gondii* e vieram a óbito entre o 14º e o 21º dia após a inoculação, com uma média por grupos variando de 15,2 a 20 dias. A infecção foi confirmada através da visualização de taquizoítas em esfregaços do pulmão dos animais infectados (Figura 3). Três grupos, dentre os quatro com camundongos com infecção aguda, apresentaram animais com cistos teciduais no cérebro.



**Figura 3.** Taquizoíta isolado do pulmão de camundongo inoculado (seta). Aumento de 400x.

Um dos grupos bioensaiados apresentou um camundongo que veio a óbito no 20º dia, após a inoculação, mas a infecção não foi constatada nele. Apesar disso, uma repassagem para um novo grupo de 5 camundongos foi realizada. Todos estes sobreviveram após 6 semanas da inoculação e se mostraram soronegativos, indicando que a morte desse indivíduo ocorreu provavelmente por motivos alheios à toxoplasmose.

Os 55 camundongos que não vieram a óbito, após 6 semanas da inoculação (73,33%) passaram por triagem sorológica através da reação de imunofluorescência indireta, onde 50 deles (90,90%) apresentaram-se sorologicamente negativos. A não infecção por *T. gondii* foi ainda confirmada através do exame de fragmentos do cérebro destes animais, nos quais não foram encontrados cistos do parasito. Cinco animais de um mesmo grupo apresentaram-se soropositivos na RIFI e cistos contendo bradizoítas foram encontrados nos tecidos cerebrais de quatro deles (Figura 4), comprovando assim uma infecção crônica e assintomática por *T. gondii*.



**Figura 4.** Cisto tecidual em cérebro de camundongo bioensaiado (seta). Aumento de 400x.

Com isso, o coeficiente de letalidade dos isolados obtidos (percentual de óbito por toxoplasmose entre os camundongos infectados) foi de 82,61% nesta pesquisa.

Na tabela 5 consta um resumo de dados relativos aos isolados obtidos, considerando os municípios de procedência e o título de anticorpos anti-*T. gondii* das aves.

**Tabela 5.** Número de infectados, percentual de óbitos e sobrevivência de camundongos em grupos do bioensaio com obtenção de isolados de *Toxoplasma gondii*, de acordo com município de procedência e títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* das aves, São Luís – MA, 2015.

GRUPO	Município	Título	Bioensaio*			
			Óbitos/infectados	% de óbitos	Sobrevivência pós inoculação (dias)	Média (dias)
G1	Raposa	1:8192	5/5	100	15-16	15,40
G2	São José de Ribamar	1:1024	5/5	100	15-17	15,60
G3	São José de Ribamar	1:1024	5/5	100	19-21	20,00
G4	Paço do Lumiar	1:256	4/4	100	14-17	15,25
G5	Paço do Lumiar	1:1024	0/4	0	--	--

\*Grupos com 5 camundongos inoculados. – não houve óbito.

### 5.3 Análise Genotípica

A análise dos fragmentos de restrição por eletroforese em gel de agarose para os cinco isolados encontrados (TgCkBrMA 1-5) permitiu identificar quatro genótipos distintos. Os resultados da genotipagem dos isolados de *T. gondii* está apresentado na tabela 6.

Os isolados dos grupos de bioensaio G2 e G3, originários de uma mesma propriedade no município de São José de Ribamar, apresentaram alelos iguais para todos os loci analisados, sendo assim classificados como o mesmo genótipo. Nenhuma linhagem clonal do Tipo I, II ou III foi encontrada, mas a linhagem clonal brasileira do tipo BrI (genótipo #6) foi detectada em um dos isolados (Grupo G4). Os isolados dos grupos G1, G2, G3 e G4 demonstraram alta virulência em camundongos, com 100% de óbitos em infectados.

No isolado do grupo G5 um genótipo inédito foi identificado, o qual não foi letal aos camundongos infectados.

A relação entre o isolado identificado, o município de procedência e mortalidade em camundongos pode ser visualizada na tabela 7.

**Tabela 6.** Genótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de galinhas de criação livre pela técnica de PCR-RFLP, provenientes dos municípios da ilha de São Luís-MA, 2015.

Grupo Bioensaio	PCR - RFLP												ToxoDB PCR-RFLP genotype #	Identidade com outros isolados brasileiros (Estado)
	SAG1	5'3'SAG2	alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	C29-2	L358	PK1	apico	CS3		
G1	I	I	II	III	III	III	III	I	III	III	III	II	#109	TgCkBr177(CE) <sup>a</sup> TgCkBr249,250,252(ES) <sup>b</sup> TgPgBrRN1(RN) <sup>c</sup>
G2	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	I	#07	TgCkBr111, 112 (PA) <sup>d</sup> TgCkBr182(CE) <sup>a</sup> , TgCkBr196 (MS) <sup>e</sup> (CS3=III)
G3	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	I		
G4	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	I	#06 (BrI)	TgCkBr10 (SP); 55, 79, 86, 87(RJ); 98, 101, 102, 104 (PR); 123, 124 (RO); 144 (PA) <sup>a</sup> TgckBr265, 273, 277, 281(ES) <sup>b</sup> TgCkBr201, 203, 207(MS) <sup>e</sup> TgCatBr2, 12, 17, 21, 30 (PR) <sup>f</sup> TgCatBr42, 47, 53, 54, 55, 62, 71, 75(SP) <sup>g</sup> TgDgBr3, 7 (SP) <sup>h</sup> TgShBr8, 9, 10, 11, TgGtBr2, 3, 4, 9 (SP) <sup>i</sup> ; TgBrCp14 (SP) <sup>j</sup> , TgSbaBr2(MG) <sup>l</sup> ; CH4, CH5(MG) <sup>m</sup> ; 534N(SP) <sup>n</sup>
G5	I	III	III	I	I	III	II	I	I	III	III	III	NEW	Nesta pesquisa.

<sup>a</sup> TgCkBr (SP), (RJ), (PR),(RO), (RN), (BA), (CE), (SE) e (AL): isolado de galinha nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rondônia, Rio Grande do Norte, Bahia, Ceará, Sergipe e Alagoas, respectivamente, genotipado por Dubey et al. (2008).

<sup>b</sup>TgCkBr (ES): isolado de galinha no estado do Espírito Santo, genotipado por Pena et al. (2013).

<sup>c</sup> TgPgBr (RN): isolado de suíno no estado do Rio Grande do Norte, genotipado por CLEMENTINO ANDRADE et al. (2013).

<sup>d</sup> TgCkBr (PA): isolado de galinha no estado do Pará, genotipado por Dubey et al. (2007b).

<sup>e</sup> TgCkBr (MS): isolado de galinha no estado do Mato Grosso do Sul, genotipado por Soares et al. (2011).

<sup>f</sup> TgCatBr (PR): isolado de gato no estado do Paraná, genotipado por Su et al. (2006).

<sup>g</sup> TgCatBr (SP): isolado de gato no estado de São Paulo, genotipado por Pena et al. (2008).

<sup>h</sup> TgDgBr (SP): isolado de cão no estado de São Paulo, genotipado por Dubey et al. (2007b).

<sup>i</sup> TgShBr; TgGtBr (SP): isolados de ovinos e caprinos, respectivamente, no estado de São Paulo, genotipado por Ragozo et al. (2010).

<sup>j</sup> TgBrCp (SP): isolado de capivaras no estado de São Paulo, genotipado por Yai et al. (2009).

<sup>l</sup> TgSbaBr (MG): isolado de tatu no estado de Minas gerais, genotipado por Vitaliano et al. (2014).

<sup>m</sup> CH (MG): isolado de galinha no estado de Minas gerais, genotipado por Silva et al. (2014).

<sup>n</sup> 534N (SP): isolado de humano no estado de São Paulo, genotipado por Ferreira et al. (2011).

**Tabela 7.** Município de procedência, percentual de óbitos e isolados obtidos nos diferentes grupos de camundongos bioensaiados, 2015.

GRUPO	Município	Isolado ID <sup>2</sup>	ToxoDB PCR-RFLP genotype #	Bioensaio <sup>1</sup>			Média (dias)
				Óbitos/infectados	% de óbitos	Sobrevida pós inoculação (dias)	
G1	Raposa	TgCkBrMA1	#109	5/5	100	15-16	15,40
G2	São José de Ribamar	TgCkBrMA2	#07	5/5	100	15-17	15,60
G3	São José de Ribamar	TgCkBrMA3	#07	5/5	100	19-21	20,00
G4	Paço do Lumiar	TgCkBrMA4	#06 (BrI)	4/4	100	14-17	15,25
G5	Paço do Lumiar	TgCkBrMA5	NEW	0/4	0	--	--

<sup>1</sup>Grupos com 5 camundongos inoculados. – não houve óbito.

<sup>2</sup>Tg: *Toxoplasma gondii*; Ck: Chicken; Br: Brasil; MA: Maranhão.

## 6 DISCUSSÃO

O convívio com outras espécies, más condições sanitárias do ambiente e a inclusão de sobras de alimentos humanos e de outras espécies na alimentação dos animais são fatores que tornam o ambiente de alto risco para a infecção por *Toxoplasma gondii* (PEREIRA et al., 2012) e podem justificar a frequência de 25,0% (15/60) de anticorpos anti-*T. gondii* encontrada nas galinhas de criação livre neste estudo (Tabela 1).

Mesmo com aparente semelhança nos ambientes das criações (APÊNDICE B), sendo todos com chão de terra, com possibilidade de livre acesso de gatos, presença de outras espécies juntamente com as aves e oferta de resto de alimentos e grãos para os animais, observou-se entre aos municípios analisados uma maior frequência relativa de animais soropositivos no município de Paço do Lumiar com 46,7%, seguido do município de São José de Ribamar com 26,7%, seguido de São Luís e Raposa, ambos com 13,3%.

No Brasil, há diversos trabalhos sobre a prevalência de *T. gondii* em galinhas identificada por exames sorológicos, como os de Casartelli-Alves et al. (2012) que também utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta encontraram uma prevalência de 27,6% na cidade de Rio Bonito, estado do Rio de Janeiro; Oliveira et al. (2009) que examinaram galinhas de diferentes estados do nordeste através do teste de aglutinação modificada (MAT) encontrando um total de 53,3% de animais soropositivos; e Clementino Andrade et al. (2013) que através do método de ELISA relataram uma prevalência de 69,77% em galinhas de criação livre no Rio Grande do Norte. Entretanto, a comparação dos valores encontrados aqui com pesquisas realizadas anteriormente deve ser cautelosa, tendo em vista que o tipo de amostragem utilizado foi o por conveniência e que os trabalhos em questão muitas vezes utilizam métodos sorológicos diferentes.

A correlação entre soropositividade e a idade das aves não pode ser realizada pelo fato da maioria dos proprietários não saber a idade exata dos indivíduos, havendo relatos de aves entre 6 meses e 5 anos. Segundo Dubey (2010) a idade é um fator que pode influenciar na frequência de soropositividade em galinhas de criação livre, onde aves mais velhas possuem maior chance ter entrado em contato com o parasito ao longo da vida.

No presente trabalho, *T. gondii* foi isolado de 33,3% (5/15) das galinhas soropositivas, sugerindo que pode existir uma correlação da presença de isolados com títulos mais altos de anticorpos das aves. Os isolados foram obtidos de aves com título mínimo de 1:256. Essa mesma associação foi encontrada por Pena et al. (2006), em estudo em gatos, e por

Oliveira et al. (2009), Beltrame et al. (2012) e Holsback et al. (2012), com isolamentos de *T. gondii* em galinhas.

O percentual de isolamento de *T. gondii* a partir de animais soropositivos é bastante variável. Para Andrade et al. (2013), utilizando o ELISA como método sorológico em animais domésticos diversos este valor foi de 28,40%, semelhante ao encontrado por Oliveira et al. (2009) em galinhas soropositivas através do MAT, que foi de 28,39%. Neste mesmo trabalho, especificamente no município de Chapadinha, estado do Maranhão, Oliveira et al. (2009) relataram um percentual de isolamento de apenas 17,28%. Para Brandão et al. (2006), utilizando a RIFI como método de triagem sorológica em galinhas de criação livre, o percentual de isolamento foi um pouco maior, registrando-se 39,28%, mas ainda muito aquém do alcançado por Dubey et al. (2002) em galinhas soropositivas através do MAT, que foi de 75%.

O não isolamento do parasito a partir de animais soropositivos pode ser justificado pela presença de falsos positivos nos testes sorológicos para *T. gondii*. A RIFI, especificamente, apesar de bastante sensível no diagnóstico sorológico de *T. gondii* em galinhas, possui baixa especificidade, o que pode favorecer a ocorrência de falsos positivos. Para Casartelli et al. (2014) estes resultados podem ser originados de reações cruzadas com outros parasitos do filo Apicomplexa, como *Sarcocystis* ou *Neospora*, que infectam naturalmente galinhas de criação livre. Uma outra explicação seria problemas com o inóculo a ser utilizado no bioensaio, como a utilização de tecidos não parasitados, a ausência de parasitos viáveis ou mesmo uma carga parasitária baixa, sendo, portanto, incapaz de infectar camundongos.

Em dois grupos (G4 e G5), dentre os cinco onde se obteve isolados, um dos camundongos inoculados não teve a infecção confirmada (tabela 6). Estes dados podem indicar falhas durante a inoculação ou que havia pouco parasitos nesses inóculos, além de uma parte dos bradizoítas liberada dos cistos ser destruída durante o processo de digestão em pepsina ácida (DUBEY et al., 2002).

Diferentemente de cepas isoladas principalmente na América do Norte e Europa, os isolados de *T. gondii* no Brasil são bastante diversos, onde através da análise por vários marcadores genéticos se percebeu uma relação filogenética altamente reticulada, sugerindo que a recombinação apresenta um importante papel na diversificação desta espécie no país (PENA et al., 2008; SOARES et al., 2011).

No presente estudo, o resultado da genotipagem revelou 4 genótipos distintos (tabela 7), dentre os quais, o do isolado do grupo G1 (TgCkBrMA1) já descrito em galinhas por Dubey et al. (2008) e Pena et al. (2013) nos estados do Ceará e Espírito Santo, respectivamente;

e em suínos por Clementino Andrade et al. (2013) no Rio Grande do Norte, e identificado como #109 (Toxo DB RFLP). Foi verificado 100% de óbitos entre 15-16 dias PI nos camundongos infectados, corroborando com os resultados de Clementino Andrade et al. (2013), que apresentaram entretanto, uma sobrevivência de apenas 9 dias para camundongos infectados.

Os isolados TgCkBrMA2 e TgCkBrMA3, dos grupos G2 e G3, respectivamente, apresentaram alelos iguais para todos os loci analisados, sendo assim considerados como um mesmo genótipo. Ambos foram isolados a partir de aves de uma mesma propriedade, o que sugere que sejam clones. O referido genótipo já havia sido encontrado em galinhas nos estados do Pará, Ceará e Mato Grosso do Sul (DUBEY et al., 2007b; DUBEY et al., 2008; SOARES et al., 2011) e denominado como #07 (Toxo DB RFLP). Na presente pesquisa, para estes isolados foi verificado 100% de óbitos entre camundongos infectados (15-21 dias PI), revelando que o genótipo na Ilha de São Luís apresenta letalidade elevada. Dubey et al. (2007b) relataram óbitos entre 62,5% dos camundongos infectados e a partir do 21º dia PI, relevando assim uma letalidade em camundongos menos acentuada que a mencionada no presente estudo. Soares et al. (2011), entretanto, não observaram óbitos entre camundongos infectados. Vale ressaltar que Soares et al. (2011) apesar de descreveram um isolado (TgCkBr196) com genótipo semelhante ao encontrado no presente estudo para os isolados TgCkBrMA2 e TgCkBrMA3, foi observada uma divergência no marcador CS3, onde o TgCkBr196 apresentava alelo tipo III e TgCkBrMA2/TgCkBrMA3 alelo tipo I. Dubey et al. (2007b) não utilizou o marcador CS3 em sua pesquisa.

O referido marcador, localizado no cromossomo VIIa do *T. gondii*, vem sendo associado à virulência do parasito em camundongos. Pena et al. (2008) mostraram, em trabalho realizado com isolados obtidos em gatos, que os camundongos infectados com isolados que possuíam o alelo tipo III para o marcador CS3 tinham um tempo de sobrevivência maior quando comparado com aqueles com alelos tipo I ou II. Informação esta que corrobora com os achados do presente estudo, apesar que devido ao número restrito de isolados não foi possível relacionar estatisticamente a ocorrência destes alelos com a mortalidade de camundongos.

O isolado do grupo G4, TgCkBrMA4, apresentou genótipo compatível com a linhagem clonal brasileira BrI (ToxoDB#6), densamente descrita em estudos nos diferentes estados do país e em hospedeiros variados, inclusive em seres humanos (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007b; DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008; YAI et al., 2009; SOARES et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; PENA et al., 2013; VITALIANO et al., 2014; SILVA et al.,

2014). Corroborando com o relatado por Pena et al. (2008), na presente pesquisa este genótipo se mostrou virulento aos camundongos infectados com 100% de óbito (14-17 dias PI).

Dubey et al. (2008), em pesquisa realizada com isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas de criação livre nos estados da região norte, nordeste, sul e sudeste, sugerem que as linhagens clonais brasileiras estão largamente distribuídas no território nacional, encontrando isolados tipo BrI nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Roraima e Pará. Nesse mesmo estudo foram analisados dois isolados (TgCkBr171 e TgCkBr172) do estado do Maranhão, até então os únicos descritos para o estado, porém, ambos eram de uma linhagem atípica e apresentavam o mesmo genótipo. Os referidos isolados eram avirulentos, com sobrevivência de todos os camundongos infectados, perfil semelhante ao encontrado no isolado TgCkBrMA5, do grupo G5, descrito pela primeira vez no presente estudo.

O isolado TgCkBrMA5, apresentando sequência de loci nunca descrita em outros estudos é considerado um genótipo inédito (isolado pela primeira vez), com a combinação de alelos clonais I e III em todos os loci. Todos os camundongos infectados por este isolado sobreviveram até o final da pesquisa, sendo considerados soropositivos na RIFI realizada 6 semanas PI. Cistos teciduais no cérebro puderam ser visualizados em quatro dos cinco camundongos soropositivos, confirmando assim a infecção e sugerindo que este isolado embora cause infecção não apresenta letalidade.

Em relação ao marcador CS3, dentre os isolados descritos neste estudo, apenas o TgCkBrMA5 apresentou alelo tipo III, coincidindo com o fato de ter sido o único que não ocasionou óbitos nos camundongos infectados, confirmando mais uma vez os achados descritos por Pena et al. (2008), e ratificados por Silva et al. (2014), que analisando isolados obtidos de humanos e animais domésticos também relataram o papel do gene CS3 na virulência do *T. gondii* em camundongos.

Analisando isolados do Brasil obtidos em galinhas assintomáticas, Dubey et al. (2006b) afirmaram que estes são mais patogênicos em camundongos que os isolados da Europa e América do Norte, independente do genótipo. Fato que pode ser evidenciado no presente trabalho através de um coeficiente de letalidade dos isolados de 82,61%.

Para Su et al. (2012) a diversidade genética do *T. gondii* ao redor do mundo consiste em seis grandes clados (A,B,C,D,E,F), provenientes de um pequeno número de linhagens ancestrais distintas. Os três genótipos já conhecidos descritos na presente pesquisa (#06, #07, #109 ToxoDB) se enquadram em três dos diferentes clados propostos por Su, sendo o #06 –BrI pertencente ao clado A, #07 ao clado C e #109 ao clado F, o que sugere uma alta diversidade

dos isolados presentes na ilha de São Luís. Para classificação do genótipo novo encontrado no isolado TgCkBrMA5, análises filogenéticas se fazem necessárias.

A alta proporção de genótipos distintos para *T. gondii* neste trabalho, apesar do pequeno número de isolados, vem ao encontro também com o descrito por Dubey et al. (2008) que indicam uma alta diversidade de cepas do parasito no Brasil e um grande número de genótipos únicos circulantes no ambiente.

Neste momento, é válido citar, entretanto, que em estudo realizado com galinhas no arquipélago de Fernando de Noronha, Dubey et al. (2010) encontraram uma diversidade genética do parasito relativamente mais baixa, além da identificação do genótipo tipo II, poucas vezes reportado no Brasil. Os resultados do referido estudo indicaram que a população de *T. gondii* presente na ilha é composta por genótipos únicos, além de genótipos clonais dominantes na Europa e América do Norte. Possivelmente por ser uma ilha continental, diferentemente das ilhas oceânicas do arquipélago de Fernando de Noronha, além do processo de colonização distinto do referido arquipélago, São Luís apresenta o parasito com um perfil genético diferente, com características semelhantes às encontradas no restante do Brasil, como relatamos, com a presença do tipo clonal BrI e outros isolados anteriormente descritos.

## 7 CONCLUSÕES

- A frequência de infecção por *T. gondii* em galinhas de criação livre nos municípios da ilha de São Luís - MA é um forte indicador da presença de cepas do protozoário circulando no ambiente da Ilha de São Luís;
- Títulos para anticorpos anti-*T. gondii* a partir de 1:256 na Reação de Imunofluorescência Indireta devem ser priorizados em triagem de aves para o bioensaio, pois neles as chances de isolamento do parasito parecem ser maiores;
- Os isolados encontrados na Ilha de São Luís possuem diversidade genética entre eles, semelhante aos isolados de outras regiões do país;
- Sobre o uso do locus CS3 como marcador de virulência, apesar de indicativo, os resultados obtidos neste estudo não permitem associar um padrão RFLP do referido locus com virulência em camundongos;
- O genótipo da amostra TgCkBrMA5 isolado pela primeira vez na Ilha de São Luís parece não apresentar virulência para camundongos, entretanto, há necessidade de estudos mais detalhados acerca de sua patogenicidade e virulência.

## REFERÊNCIAS

- AJIOKA, J.W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.3, p. 1-19, 2001.
- BARBOSA, H. S.; MUNO, R. M.; MOURA, M. A. O ciclo evolutivo. In: SOUZA, W. de; BELFORT Jr., R. (Org.). **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. cap 2, p. 33-45.
- BELTRAME, M. A.V.; PENA, H. F., TON, N. C., LINO, A. J., GENNARI, S. M., DUBEY J. P., PEREIRA, F. E. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 225-230, 2012.
- BICHARA, C. C.; ANDRADE, G. M. Q.; LAGO, E. G. Toxoplasmose Congênita. In: SOUZA, W. de; BELFORT Jr., R. (Org.). **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. cap 10, p. 137-155.
- BONNA, I. C. F.; FIGUEIREDO, F. B.; COSTA, T.; VICENTE, R. T.; SANTIAGO, C. A. D.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B.; MILLAR, P. R.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Estudo soropidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 186-189, 2006.
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection, do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 438-442, 2002.
- BRAGA, M. S. C.; ANDRÉ, M. R.; JUSI, M. M.; FRESCHI, C. R.; TEIXEIRA, M. C.; MACHADO, R.Z. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 107-111, 2012.
- BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R.W.A. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, n. 1-2, p. 143-149, 2006.
- BRANDÃO, V. M.; COSTA, F. B. da; SILVA, I. A. da; SILVA, D. F. da; DIAS, I. C. L.; GENNARI, S. M.; SOUZA, J. R. S. T. de; SILVA, M. I. S. Levantamento soropidemiológico da toxoplasmose em ovinos na ilha de São Luís-MA. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 720-725, 2009.
- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-169, 1974.
- CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 4, p. 518-519, 1911.

CARNEIRO, A. C. A.V.; ANDRADE, G. M.; COSTA, J. G. L.; VELOSO, B. P.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; FERREIRA, A. M.; SU, C.; JANUÁRIO, J. N.; VITOR, R. W. A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in Minas Gerais state, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 3.901-3.907, 2013.

CASARTELLI-ALVES, L.; FERREIRA, L. C.; VICENTE, R. T.; MILLAR, P. R.; OLIVEIRA, R.V.C.; AMENDOEIRA, M.R.R.; SCHUBACH, T.M.P.; MENEZES, R.C. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas criadas extensivamente em Rio Bonito, Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 5, p. 1398-1401, Oct. 2012.

CASARTELLI-ALVES, L.; BOECHAT, V.C.; MACEDO-COUTO, R.; FERREIRA, L.C.; NICOLAU, J.L.; NEVES, L.B.; MILLAR, P.R.; VICENTE, R.T.; OLIVEIRA, R.V.C.; MUNIZ, A.G.; BONNA, I.C.F.; AMENDOEIRA, M.R.R.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.; SCHUBACH, T.M.P.; MENEZES, R.C. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 1-2, p. 346-351, 2014.

CFMV - CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília: 2012. 62p.

CLEMENTINO ANDRADE, M. M.; PINHEIRO, B.V.; CUNHA, M.M.; CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE NETO, V.F.; VITOR, R.W.A. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n.6, p. 587-589, 2013.

COLA, G. A.; GARCIA, J. L.; COSTA, L. da; RUFFOLO, B.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do teste de aglutinação modificado na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ratos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 717-722, jul./set. 2010.

COSTA, M. A. S.; BEZELGA, A. L.; TRINDADE, C. D.; FIGUEIREDO NETO, J. A. Soroprevalência da Toxoplasmose no Hospital Universitário Materno Infantil de São Luís – MA, em 2008. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 17, n. 3, p. 62-66, set./dez. 2010.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, n.1-2, p. 65-70, 1996.

DUBEY, J.P. Advances in life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 28, n.7, p. 1.019-1.024, 1998a.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n.1, p. 75-77, 1998b.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, 2002.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.55, n. 6, p.467-475, 2008.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009.

DUBEY, J. P. *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.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p.267-299, 1998.

DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H.; BLACKSTON, C.R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S.M.; RAGOZO, A.M.; NISHI, S.M; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.; HILL, D.E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n.6, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L.B.; SREEKUMARA, C.; VIANNA, M.C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229–234, 2003.

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

DUBEY, J.P.; EDELHOFER,R.; MARCET, P. L.; VIANNA, M.C.; KWOK, O. C.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n.6, p. 299-306, 2005b.

DUBEY, J.P.; GOMEZ-MARIN, J. E., BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M. C. B.; HILL, D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n.6, p. 67-72, 2005c.

DUBEY, J.P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C.; MISKA, B. K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. 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, n.5, p. 1082-1095, 2005d.

DUBEY, J.P.; PATITUCCI, A. N.; SU, C.; SUNDAR N.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.76-82, 2006a.

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

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H.; FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C.; SU, C. 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, n. 3, p. 182-188, 2007a.

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

DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F.; DE OLIVEIRA, L. N.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. M.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 299-305, 2008.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M. F.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. New *Toxoplasma gondii* Genotypes Isolated from Free-Range Chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected Findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709-712, 2010.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, Londres, v.139, n.11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. 220p.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **The journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155-177, 1972.

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

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

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and Neosporosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. cap 80, p. 1-44.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n. 2, p. 190-195, 2009.

- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 2, p. 270-273, 1993.
- ELMORE, S. A.; JONES J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* epidemiology, feline clinical aspects and prevention. **Trends Parasitology**, v. 26, n. 04, p. 190-196, 2010.
- FAZAEI, A.; CARTER, P. E.; DARDE, M. L.; PENNINGTON, T. H. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 637–642, 2000.
- FERREIRA, A. de M.; VITOR, R. W. de A. Aspectos taxonômicos e evolutivos. In: SOUZA, W. de; BELFORT Jr., R. (Org.). **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. cap 1, p. 21-31.
- FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; DE MATTOS, C. C. B.; DE MATTOS, L. C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in São Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**. v.129, p. 190–195, 2011.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J. P.; GRIGG, M. E.; DE OLIVEIRA, F. C. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n.1-2, p. 33-39, jan. 2011.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as Coccidian oocysts. **Science**, v.167, p.893-896, 1970.
- GALVÃO, A. L. B.; VACONCELLOS, A. L. de; NAVARRO, I. T.; BRESCIANI, K. D. S. Aspectos da toxoplasmose na clínica de pequenos animais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 393-410, 2014.
- GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p. 161–165, 2001.
- GRIGG, M.E.; SUNDAR, N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.925-933, 2009.
- HOLSBACK, L.; PENA, H. F.; RAGOZO, A.; LOPES, E. G.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. Serologic and molecular diagnostic and bioassay in mice for detection of *Toxoplasma gondii* in free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 8, p. 721-726, ago. 2012.
- HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

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

HUTCHISON, W.M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 206, p.961-962, 1965.

JANKU, J. Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmalme avec parasite dans la rétine. **Casopis Lekaruv Ceskych**,v. 62, p.1021–1027, 1923.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Epidemiologia da Toxoplasmose. In: SOUZA, W. de; BELFORT Jr., R. (Org.). **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. cap 8, p. 117-126.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A. J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, E. R.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**. v.33, p. 80-92, 2005a.

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D. B.; SIBLEY, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5881-5887, 2005b.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; PARMLEY, S. F.; REMINGTON, J. S.; DUBEY, J. P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen- coding and housekeeping genes. **The Journal of Parasitology**, v. 86, p. 960–971, 2000.

LEVINE, N. D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Boca Raton: CRC Press, 1988. 2v.

MOURA, L. de; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n.2, p. 326-329, 2006.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a `corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C. R. Seances Acad. Sci.**, v. 147, p. 763– 766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C. R. Seances Acad. Sci.**, v.148, p. 369–372, 1909.

OLIVEIRA, L. N.; COSTA-JUNIOR, L. M.; DE MELO, C. F.; RAMOS-SILVA J. C.; BEVILAQUA, C. M.; AZEVEDO, S. S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO, D. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* Isolates from Free-Range Chickens from the Northeast Region of Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 235-237, fev. 2009.

PENA, H. F. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do estado de São Paulo**. 2004. 126f. Tese. (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F.; VITALIANO, S. N.; BELTRAME, M. A.; PEREIRA, F. E.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-2, p. 111-117, 2013.

PEREIRA, M. de F.; PEREIRA, M. F.; PEIXOTO, R. M.; LANGONI, H.; GRECA-JUNIOR, H.; AZEVEDO, S. S. de; PORTO, W. J. N.; MEDEIROS, E. S. de; MOTA, R. A. Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 32, n. 2, p. 140-146, Feb. 2012 .

RAGOZO, A. M. A. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos**. 2007. 114f. Tese. (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RAGOZO, A. M. A.; PENA, H. F.; YAI, L. E.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 307-312, 2010.

REBELO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 17, n. 1, Feb. 2001.

REMYINGTON J. S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON J. S. **Infectious diseases of the fetus & newborn infant**. Philadelphia: Editora WB Saunders, 1995. p. 947-1091.

RUIZ, A.; FRENKEL, J.K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 29, p. 1161–1166, 1980.

SABIN, A. B. Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v. 41, p. 75–80, 1939.

SANTOS, M. C. F. **Frequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras e frangos de corte em regiões dos Estados do Rio Grande do Norte e Paraíba**. 2012. 82 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

SCHLÜTER, D.; DÄUBENER, W.; SCHARES, G.; GROß, U.; PLEYER, U.; LÜDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 917-929, 2014.

SIBLEY, L.D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, p. 82-5, 1992.

SILVA, L.A.; ANDRADE, R. O.; CARNEIRO, A.C.; VITOR, R. W. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in southeastern Brazil. **Plos one**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2014.

SILVEIRA, L. H. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul**. 2009. 135f. Tese. (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOARES, R.M.; SILVEIRA, L. H.; DA SILVA, A. V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E. G.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 29-34, 2011.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. **Rev. Soc. Scient**, v. 3, p.109–112, 1908.

SU, C.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma*. In: LIU, D. (Ed.) **Molecular Detection of Foodborne Pathogens**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 741–753.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n.6, p. 841-848, 2006.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; ZHU, X. Q.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n.15, p. 5844-5849, abr. 2012.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217–1258, 2000.

VITALIANO, S. N.; SOARES, H. S.; MINERVINO, A. H.; SANTOS, A. L.; WERTHER, K.; MARVULO, M. F.; SIQUEIRA, D. B.; PENA, H. F.; SOARES, R. M.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 3, p. 276-283, 2014.

YAI, L. E.; RAGOZO, A. M.; SOARES, R. M.; PENA, H. F.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 332-337, 2009.

ZHAO, G.; SHEN, B.; XIE, Q.; XU, L.; YAN, R.; SONG, X.; ADAM, H. I.; LI, X. Isolation and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 8, p. 1347-1353, 2012.

## **APÊNDICES**

**APÊNCIDE A - NÚMERO DE AVES (*Gallus domesticus*) ADQUIRIDAS POR COLETA, DE ACORDO COM O SEXO, NOS DIFERENTES MUNICÍPIOS E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DAS CRIAÇÕES.**

Coleta	N. de Aves Adquiridas			Município	Coordenadas Geográficas
	Fêmeas	Machos	Total		
1	5	0	5	Paço do Lumiar	-2.513852, -44.165212
	4	1	5	Raposa	-2.468892, -44.163897
	3	2	5	São José de Ribamar	-2.551074, -44.056737
	5	0	5	São Luís	-2.639033, -44.203465
2	5	0	5	Paço do Lumiar	-2.460412, -44.133025
	5	0	5	Raposa	-2.421509, -44.096359
	5	0	5	São José de Ribamar	-2.468638, -44.195676
	5	0	5	São Luís	-2.513539, -44.262275
3	4	1	5	Paço do Lumiar	-2.554205, -44.157905
	5	0	5	Raposa	-2.458500, -44.145396
	5	0	5	São José de Ribamar	-2.562338, -44.193734
	4	1	5	São Luís	-2.555754, -44.258182
<b>TOTAL</b>	55	5	60		

**APÊNCIDE B - VISUALIZAÇÃO DE LOCAIS ONDE AS AVES (*Gallus domesticus*) CONVIVEM NATURALMENTE COM FELINOS E OUTRAS ESPÉCIES ANIMAIS.**

