

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

NATASCHA TREVISANI

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* OBTIDOS DE *Gallus gallus*
NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.**

LAGES
2013

NATASCHA TREVISANI

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* OBTIDOS DE *Gallus gallus*
NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.**

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Anderson Barbosa de Moura

LAGES

2013

NATASCHA TREVISANI

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* OBTIDOS DE *Gallus gallus*
NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.**

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientador: _____

Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____

Profa. Dra. Solange Maria Gennari
Universidade de São Paulo

Membro: _____

Prof. Dr. Antonio Pereira de Souza
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____

Profa. Dra. Carla Ivane Ganz Vogel
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages SC, 21/02/2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao grande criador, DEUS, por existir, ter saúde, ser feliz e realizada. A vocês, Marlete e Maurício, agradeço por ser filha dos melhores pais do mundo, por todos esses anos juntos e pela presença de vocês em cada etapa cumprida até então. Pois, mesmo sem sequer entender o título do meu projeto me apoiaram incondicionalmente. É, a filha de vocês vai ser professora, sim!

À CAPES, pela concessão da bolsa de pós-graduação. À Universidade do Estado de Santa Catarina e a todos os professores do Centro de Ciências Agroveterinárias, em especial aos do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, agradeço pelos conhecimentos passados que me engrandeceram tanto. E a você, meu orientador, Prof. Anderson, agradeço pela paciência, companheirismo e por ser sua primeira aluna orientada no Mestrado. Ao pessoal do laboratório, obrigada por tudo, pela amizade e por me ajudar a cuidar dos camundongos.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao professor João Luis Garcia obrigada pela oportunidade de realizar parte do meu trabalho, ao mestre Luiz Daniel de Barros pela grande ajuda e paciência, e as pessoas maravilhosas residentes, alunos, mestrandos e doutorandos, amigos que pude conhecer e que jamais esquecerei.

Aos meus irmãos, Nicole e Paolo, minha vó Zelma, ao meu namorado Ricardo que com certeza teve a maior influência nessa etapa e que participou ativamente de tudo me apoiando sempre, e também a toda sua família.

A todo belo povo catarinense que recebeu o pessoal da Parasitologia em suas casas e permitiram que a pesquisa a campo fosse realizada. Enfim, a todos que sabem o quando este título significa para mim.

“Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pequena. Quem quer passar além do bojador tem que passar além da dor. Deus ao mar o perigo e o abismo deu, mas nele é que espelhou o céu”.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

TREVISANI, NATASCHA. **Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de *Gallus gallus* naturalmente infectados no estado de Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Parasitologia Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, que acomete animais homeotérmicos, incluindo as aves e o ser humano. Galinhas, assim como outras aves, são consideradas indicadoras de contaminação ambiental. *Toxoplasma gondii* possui uma estrutura populacional altamente clonal, constituída por três linhagens, designadas I, II e III com alta frequência de recombinação, o que resulta na grande diversidade genotípica observada no Brasil. Estudos recentes têm demonstrado a importância da genotipagem dos isolados de *T. gondii* considerando a relação de diferentes genótipos com as distintas patologias observadas nos hospedeiros. A realização do presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar genotipicamente *T. gondii* de galinhas (*Gallus gallus*) naturalmente infectadas do estado de Santa Catarina. Soros de 133 aves criadas extensivamente foram analisados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI $\geq 1:16$) para detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*. Para o isolamento do parasito (bioensaio em camundongos) foram utilizados coração e cérebro de 30 aves soropositivas na RIFI. Os isolados obtidos foram submetidos à caracterização genotípica por meio da PCR-RFLP utilizando 12 marcadores genéticos (SAG1, 5'-3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3). Os resultados obtidos foram classificados de acordo com os genótipos presentes no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). Das 133 amostras de soros de galinhas analisadas, 84 (63,16%) foram positivas, com títulos de anticorpos variando de 1:16 a 1:1024. No bioensaio foram obtidos 11 isolados (Ck 3, Ck 32, Ck 35, Ck 56, Ck 63, Ck 89, Ck 102, Ck 103, Ck 125, Ck 127 e Ck 128). Pela análise genotípica revelou-se a presença de seis genótipos, três dos quais classificados como #26, #53 e #120 e três não descritos anteriormente, denominados NEO 1, NEO 2 e NEO 3. Em dois isolados não foi possível amplificar todos os marcadores, entretanto foi realizada a 18S rDNA PCR-RFLP, para diferenciar de outros apicomplexas (*Neospora* spp. e *Sarcocystis* spp.), e que confirmou estes como *T. gondii*. O presente trabalho ratifica a ampla diversidade genética do parasito verificada no Brasil sendo este o primeiro mapeamento dos genótipos do protozoário, a partir de galinhas naturalmente infectadas, que ocorrem no estado de Santa Catarina.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. *Gallus gallus*. Genotipagem. PCR-RFLP.

ABSTRACT

TREVISANI, NATASCHA. **Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from *Gallus gallus* naturally infected in the state of Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Parasitologia Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

Toxoplasmosis is a widely-distributed zoonosis that can infect warm-blooded animals, including birds and humans. Chickens, as well as other birds, can be considered indicators of environmental contamination. *Toxoplasma gondii* has a distinct clonal populational structure of three lineages (I, II and III) with high recombination, resulting in wide genotypic diversity in Brazil. Recent studies have demonstrated the importance of *T. gondii* genotyping regard the relationship between genotypes and distinct clinical signs in hosts. This study aimed to isolate and characterize *T. gondii* isolates from chickens (*Gallus gallus*) naturally infected in the state of Santa Catarina. Serum samples from 133 fowls raised in free-range conditions were analyzed by Immunofluorescence Assay (IFA \geq 1:16) to detect IgG antibodies to *T. gondii*. Brain and heart tissues from 30 seropositives (IFA) chickens were used to isolate the parasite (bioassay in mice). The isolates were subjected to genotypic characterization by PCR-RFLP using 12 genetic markers (SAG1, 5'-3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico and CS3). The results were classified according to the genotypes present in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). Among 133 chicken serum samples analyzed, 84 (63.16%) were positive, with antibody titers ranging from 1:16 to 1:1024. Eleven isolates were obtained in the assay (Ck 3, Ck 32, Ck 35, Ck 56, Ck 63, Ck 89, Ck 102, Ck 103, Ck 125, Ck 127 and Ck 128). Genotyping revealed six genotypes, three of them were classified as #26, #53 and #120 and three were not previously described, denominated NEO 1, NEO 2 e NEO 3. In two isolates it was not possible to amplify all markers, but the 18S rRNA PCR-RFLP was performed for differentiation of other apicomplexans (*Neospora* spp. and *Sarcocystis* spp.) and it was confirmed as *T. gondii*. The present study confirms the high genetic diversity of the parasite observed in Brazil and this is the first mapping of genotypes obtained from naturally infected chickens in the state of Santa Catarina.

Key-words: *Toxoplasma gondii*. *Gallus gallus*. Genotyping. PCR-RFLP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Locais das colheitas de sangue de *Gallus gallus* nas seis mesorregiões e respectivas cidades do estado de Santa Catarina. 1 - Grande Florianópolis. 2 - Norte. 3 - Oeste. 4 - Serrana. 5 - Sul. 6 - Vale do Itajaí.....20
- Figura 2 - Isolamento e genotipagem de *T. gondii* no estado de Santa Catarina. A - Colheita de sangue das aves. B - Sorologia por meio da RIFI. C - Necropsia das aves. D - Bioensaio em camundongos. E - Pesquisa de cisto do protozoário no cérebro dos camundongos. F - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR-RFLP.....22
- Figura 3 - Fotomicrografia de cérebro de camundongo contendo cisto de *Toxoplasma gondii* (seta – aumento 400X).....38
- Figura 4 - Genotipagem por PCR-RFLP de *Toxoplasma gondii* isolados de *Gallus gallus* naturalmente infectados. Análise de restrição de produtos amplificados do “locus” L358 em gel de agarose 2,5% com as endonucleases *HaeIII* e *NlaIII* (PM 100pb).....39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Bioensaio para isolamento de *Toxoplasma gondii* a partir de cérebro e/ou coração de aves (*Gallus gallus*) naturalmente infectadas.....24
- Tabela 2 - Marcadores, “primers”, tamanhos de fragmentos obtidos e enzimas de restrição utilizados para genotipagem de *Toxoplasma gondii* isolados de galinhas naturalmente infectadas. Lages, 2013.....27
- Tabela 3 - Recíproca dos títulos de anticorpos (RIFI) contra *Toxoplasma gondii* das galinhas, número de camundongos inoculados (n), título (RIFI), formas evolutivas de *T. gondii* e virulência observadas nos camundongos nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina. Lages, 2013.....30
- Tabela 4 - Relação do número de camundongos inoculados (bioensaio) e da presença das formas evolutivas de *T. gondii* observadas no exame histopatológico, nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina. Lages, 2013.....37
- Tabela 5 - Genotipagem de “multilocus” de *Toxoplasma gondii* isolados de galinhas (*Gallus gallus*) por PCR-RFLP. Lages, 2013.....40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
3 OBJETIVOS	19
3.1 GERAL	19
3.2 ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	19
4.2 LOCAL E OBTENÇÃO DAS AVES	20
4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	20
4.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	21
4.5 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS	22
4.6 HISTOPATOLOGIA (HE)	25
4.7 GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	25
4.7.1 Extração do DNA	25
4.7.2 PCR -RFLP.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 SOROLOGIA DAS AVES	28
5.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS	30
5.3 RESULTADOS DO HISTOPATOLÓGICO	36
5.4 PCR-RFLP	38
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose que apresenta ampla distribuição mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* que é capaz de infectar os animais homeotérmicos, aves e mamíferos, manifestando diferentes formas da doença nos hospedeiros. Destaca-se ainda o importante papel da saúde pública na investigação dos casos nos seres humanos, a gravidade da doença nos imunocomprometidos e gestantes soronegativas, além das perdas causadas na pecuária, principalmente decorrente dos problemas reprodutivos.

Estudos recentes têm demonstrado a importância da genotipagem dos isolados de *T. gondii*, considerando a possibilidade de haver relação dos diferentes genótipos com as distintas patogenicidades causadas em humanos e animais.

O estado de Santa Catarina é dividido geograficamente em seis mesorregiões: Norte, Oeste, Serrana, Vale do Itajaí, Grande Florianópolis e Sul. No Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foi registrado, no ano de 2010, uma população de 6.248.436 habitantes, em uma área de 95.703,478Km² e 293 municípios. De acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal do IBGE (2011) o número total de cabeças de galinhas no País era de 216.219.543 animais e Santa Catarina apresentava 16.977.756 cabeças, sendo que aproximadamente 75% da população de galinhas do estado encontra-se na mesorregião Oeste. Porém, essa quantidade de aves no País muitas vezes é subestimada, pois o número exato de galinhas caipiras não é contabilizado.

O isolamento do agente, por meio da infecção experimental em camundongos (bioensaio) e a tipificação genética da cepa são importantes ferramentas para auxiliar na determinação da patogenicidade e avaliação da evolução clínica do parasitismo. Segundo a literatura consultada, Santa Catarina carece de um mapeamento da ocorrência dos diferentes genótipos do agente no estado.

Um diagnóstico mais acurado do risco epidemiológico que representam os diferentes genótipos, ora mapeados em Santa Catarina, também é importante ferramenta para um melhor conhecimento da enfermidade no estado, propiciando condições para a adoção correta de medidas preventivas.

Objetivando o mapeamento da distribuição dos diferentes genótipos em Santa Catarina, *T. gondii* foi isolado, a partir de *Gallus gallus* infectados naturalmente, por meio do bioensaio em camundongos, e caracterizado genotipicamente pela técnica de PCR-RFLP “multilocus”, usando-se marcadores de alta resolução, a fim de ampliar os conhecimentos sobre a diversidade genética do *T. gondii* no estado de Santa Catarina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Toxoplasma gondii é um coccídio que parasita os felídeos, como hospedeiros definitivos, e os animais homeotérmicos como hospedeiros intermediários. Pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eimeriorina, Família Toxoplasmatidae e Gênero *Toxoplasma* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909). Existe apenas uma espécie do protozoário, *T. gondii* (DUBEY, 2010b). Seu nome genérico é composto pelas palavras gregas *toxon*, arco, e *plasma*, molde, pois é alongado, encurvado em arco e com uma das extremidades mais atenuada que a outra. Mede de quatro a oito micrômetros de comprimento por dois a quatro micrômetros de largura (REY, 2001).

Em 1909, Nicolle e Manceaux descreveram o parasito e denominaram o gênero *Toxoplasma* e a espécie *T. gondii* após terem encontrado, no ano de 1908, na Tunísia, formas evolutivas do protozoário no roedor africano *Ctenodactylus gondi*. No mesmo ano, no Brasil, Splendore descreveu a presença de formas evolutivas em coelhos, sem identifica-las como *T. gondii*. Durante alguns anos após sua descrição o protozoário não foi objeto de muitas pesquisas e somente a partir da década de 1970, com o conhecimento da ampla distribuição e diversidade de hospedeiros, é que seu estudo foi aprofundado (NEVES, 2005).

É um parasito intracelular obrigatório, com capacidade de invadir os mais diversos tipos de células do organismo de seus hospedeiros, com maior afinidade por células do sistema fagocítico mononuclear, leucócitos, além de células parenquimatosas que compõem os tecidos (REY, 2001). Apresenta três formas evolutivas principais: 1) Taquizoítos, formas proliferativas que ocorrem na infecção aguda; 2) Bradizoítos, que se encontram encistados formando cistos tissulares na infecção latente ou crônica e 3) Oocistos, que se formam exclusivamente no intestino dos felídeos. O ciclo biológico envolve a participação do hospedeiro definitivo (felídeo) que pode se infectar ingerindo bradizoítos menos comumente, oocistos e, raramente, taquizoítos. Neste hospedeiro ocorre o ciclo enteroepitelial, com gametogonia e reprodução assexuada, que culmina com a formação dos oocistos, eliminados através das fezes, por um período de três a 15 dias até o animal adquirir imunidade. O período pré-patente varia conforme a forma infectante, desde três a dez dias com ingestão de cistos tissulares até 20 a 24 dias com oocistos (ACHA e SZYFRES, 2003).

Um hospedeiro suscetível ao ingerir oocistos esporulados ou infectantes, encontrados em alimentos e água contaminados, cistos na carne crua ou taquizoítos no leite poderá adquirir o parasito. Este sofre o ciclo assexuado através de sucessivas divisões por

endodiogenia invadindo novas células e se disseminando pelo organismo (fase proliferativa). Com o aparecimento da imunidade ocorre a formação de cistos e cronicidade (NEVES, 2005).

Nos hospedeiros imunocompetentes a infecção geralmente ocorre de forma assintomática, enquanto naqueles imunocomprometidos (portadores do vírus da imunodeficiência adquirida, pacientes que recebem transplantes de órgãos ou quimioterapia antineoplásica) a sintomatologia se manifesta de forma variável, dependendo da imunidade individual e da virulência da cepa do parasito, sendo capaz de levar os indivíduos acometidos a morte. A toxoplasmose é considerada uma das maiores causas de mortalidade em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida - AIDS (PETERSEN, 2006).

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose pode ser realizado de diferentes maneiras, pela demonstração do coccídio (parasitológico) ou por métodos indiretos (imunológico) e, mais recentemente, por biologia molecular (FIALHO et al., 2009). De acordo com Hill e Dubey (2002) uma combinação de diferentes métodos pode ser utilizada, pois os sinais clínicos da doença são inespecíficos e não suficientemente característicos para o diagnóstico definitivo. Os sinais clínicos da toxoplasmose são confundidos com outros apresentados por diversas outras doenças infecciosas o que leva à necessidade do diagnóstico diferencial.

Existem numerosos testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *T. gondii*. Entre eles a reação de Sabin-Feldman, os testes de hemaglutinação indireta, de fixação do complemento, de inibição do complemento, de aglutinação direta, de aglutinação em látex, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de aglutinação modificado (MAT). Estes últimos três testes têm sido adaptados para detecção de imunoglobulina M (IgM). Anticorpos desta classe aparecem mais cedo, no início da infecção em relação a imunoglobulina G (IgG) e desaparecem mais rapidamente. A presença de anticorpos contra *T. gondii* detectada em uma amostra de soro apenas indica infecção passada sendo necessário realizar duas coletas com intervalo de 2 a 4 semanas (amostras pareadas) confirmando assim infecção aguda se houver um aumento no título de anticorpos. Um elevado título de anticorpos persiste por meses após a infecção (HILL e DUBEY, 2002; DUBEY, 2010b).

A demonstração do protozoário no organismo é feita por exames anatomopatológicos, após a morte ou por biópsia, sendo que a parasitemia ocorre somente na fase aguda da infecção. *T. gondii* pode ser observado, sob microscopia, em cortes ou em impressões (imprints) de tecidos, fixados e corados pela hematoxilina-eosina e/ou Giemsa. O isolamento do parasito é feito por inoculação do material suspeito em animais de laboratório, sendo o camundongo albino o modelo de escolha devido a sua sensibilidade à infecção. A via de

inoculação é comumente a intraperitoneal sendo feita a avaliação do exsudato peritoneal para a pesquisa de taquizoítos. A semeadura em cultura de tecidos e coloração pelo Método de Wright-Giemsa também são técnicas relatadas (REY, 2001).

O isolamento é amplamente utilizado, pois a concentração do protozoário em tecidos de animais cronicamente e naturalmente infectados geralmente é baixa. De acordo com Rosa et al. (2001) o bioensaio é uma técnica bastante sensível, porém, muito onerosa e demorada se comparado à imunohistoquímica considerada específica e mais rápida. Mas, ressalta que o bioensaio em camundongos continua sendo o melhor método para a detecção do *T. gondii* em tecidos de animais assintomáticos.

Ainda pode ser realizada a pesquisa de oocistos nas fezes dos felinos pelo método de centrífugo-flutuação em solução de Sheather, no período da eliminação ativa, que dura uma a duas semanas (ciclo enteroepitelial que ocorre somente no hospedeiro definitivo). Esta não é considerada uma técnica muito sensível, pois a maioria dos gatos apresenta-se assintomática no período de eliminação (FIALHO et al., 2009).

Com o advento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) houve uma revolução no diagnóstico dos agentes causadores de doenças infecciosas em geral, no entanto, devido ao alto custo e complexidade, além da possibilidade de ausência do DNA do protozoário circulando no organismo, esta técnica tem seu uso limitado para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*. Contudo, tem sido extremamente útil na detecção do parasito no meio ambiente ou em casos de pacientes com infecção aguda. A PCR, embora seja de pouco valor nas infecções crônicas humanas, pode ser utilizada com sucesso para determinar qual cepa de *T. gondii* é responsável por causar a infecção (BOOTHROYD, 2009).

A análise do comprimento do fragmento de restrição (restriction fragment length polymorphism - RFLP) de "locus" gênicos específicos tem sido cada vez mais utilizada para genotipagem de isolados de *T. gondii*. Marcadores RFLP são utilizados em análises de alto rendimento usando amplificação por PCR, seguida da digestão por enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose. Esta técnica tem sido utilizada para caracterizar isolados coletados em todas as partes do mundo, agrupando eles em três grupos, referidos como I, II e III (SIBLEY et al., 2009).

As características genotípicas e fenotípicas das diferentes cepas do parasito são descritas conforme alguns critérios principais para diferenciação sendo consideradas a virulência (manifestação clínica em animais de laboratório), a análise genética e a estrutura populacional. As cepas mais virulentas se caracterizam por invasão tecidual severa sendo de alta patogenicidade e isoladas de animais clinicamente doentes ou mortos pela infecção. Já as

cepas de menor virulência normalmente apresentam baixa patogenicidade e restrita invasão tecidual e são isoladas de animais assintomáticos (SOULSBY, 1987).

O modelo experimental para a avaliação fenotípica da virulência é a inoculação em camundongos. Nesta espécie animal as diferentes cepas são classificadas em: altamente virulentas, quando um parasito causa a morte do animal; pouco virulenta, quando evolui para a infecção crônica sem a necessidade de tratamento específico; e de virulência intermediária, quando o parasito não é suficiente para matar o camundongo e o tratamento utilizando altas doses de sulfonamidas é suficiente para evitar a morte (FREYRE et al., 2001).

Howe e Sibley (1995) classificaram a estrutura populacional do *T. gondii* em três diferentes linhagens clonais típicas e clássicas I, II e III e descreveram que os isolados do protozoário apresentam diferentes virulências que podem ser demonstradas a partir da inoculação em camundongos. A maioria das amostras consideradas virulentas para esta espécie pertence ao tipo I e os tipos II e III são considerados não virulentos levando à formação de cistos teciduais e ao desenvolvimento da doença na forma crônica.

Entende-se por estrutura populacional altamente clonal a classificação dos organismos que, conforme evoluem geram progêneses idênticas ou muito semelhantes entre si. Dessa forma, os genótipos conhecidos se propagam pelas gerações seguintes sendo estáveis por longo período de tempo e as modificações no genoma, que porventura ocorrerem, serão mínimas e se devem a recombinações derivadas das trocas gênicas (SOARES, 2004).

De acordo com Grigg et al. (2001) a grande maioria das cepas (>94%) são classificadas em uma das três distintas linhagens clonais, denominadas como “tipo” I, II e III e a recombinação meiótica em populações naturais do protozoário tem levado ao aumento da diversidade e à variação genética. O sequenciamento de múltiplos “loci” destas três linhagens revela que a configuração genotípica de *T. gondii* é formada pelas diferentes combinações de, basicamente, duas classes de alelos. Assim, por exemplo, para um determinado “locus” as linhagens I e II compartilham certa classe de alelo, enquanto o alelo do tipo III é diferente. Em outro “locus” as linhagens que compartilham alelos similares são os tipos I e III, ficando o tipo II como o alelo distinto.

Conforme descrito por Dardé (2004) o tipo I é raramente isolado na Europa e EUA (10% dos casos isolados, principalmente, de seres humanos), é altamente virulento para camundongos, levando todos os animais a morte (< 10 taquizoítos) e apresenta uma alta taxa de multiplicação “in vitro” com reduzida interconversão taquizoíto-bradizoíto. O Tipo II, mais comumente isolado (80% dos casos) na Europa e EUA a partir de humanos e animais como ovinos e suínos, é considerado não virulento para camundongos levando-os à infecção

crônica, apresenta baixa taxa de multiplicação “in vitro” e fácil interconversão taquizoíto-bradizoíto, com formação de cistos. Isolados do tipo III são considerados raros na Europa e EUA, sendo mais frequente entre aqueles provenientes de animais silvestres de diferentes regiões, comumente não causam doença em seres humanos e frequentemente são mais virulentos para camundongos em relação ao tipo II.

Em casos de toxoplasmose ocular humana grave em pacientes adultos imunocompetentes, recidivantes e refratários ao tratamento, e nos surtos de toxoplasmose aguda são descritos isolados do tipo I. Os tipos II e III não foram relatados nestas condições (GRIGG et al., 2001; LEHMAN et al., 2000). Amostras isoladas de casos clínicos humanos provenientes da Espanha revelaram que o tipo II predominava em pacientes imunocomprometidos e o tipo I em casos de infecção congênita (FUENTES et al., 2001). Apesar dos casos isolados de ser humano diretamente de material oriundo de casos sintomáticos, sem inoculação em camundongos, na sua maioria serem descritos como tipo I, os tipos II e III são mais frequentemente obtidos de amostras de animais (HOWE e SIBLEY, 1995). Apesar desta afirmação, é importante destacar que os estudos de toxoplasmose no ser humano são normalmente derivados de amostras clínicas enquanto nos animais a maioria dos trabalhos é realizada a partir de tecidos de animais assintomáticos, eutanasiados para este fim (SOARES, 2004).

Pena et al. (2008) em 11 regiões brasileiras, realizaram estudo para avaliação da estrutura populacional e da virulência do protozoário a partir do isolamento em camundongos (bioensaio). A genotipagem foi realizada utilizando dez marcadores moleculares, entre eles o CS3, sendo obtidos 46 isolados provenientes de gatos. Comparando os resultados obtidos no estudo com 125 isolados provenientes de galinhas, cães e gatos brasileiros, os autores descreveram a presença de 48 genótipos diferentes e que quatro destes foram isolados de diversos hospedeiros e diferentes regiões geográficas. Propuseram então a denominação das diferentes linhagens obtidas como BrI, BrII, BrIII e BrIV próprias do Brasil e que estão relacionadas com os tipos clonais já descritos anteriormente. Ao relacionar com a virulência foi determinado que BrI é a mais virulenta, BrII e IV apresentam virulência intermediária e que BrIII não é virulenta. Ainda, concluíram que o marcador CS3 permitiu reforçar a existência de correlação entre genótipo e a virulência em camundongos.

O primeiro estudo de genotipagem de isolados de *T. gondii* obtidos de animais realizado no Brasil foi delineado por Dubey et al. (2002). No estado de São Paulo, zona rural, foram avaliadas 82 galinhas criadas livremente sendo possível a obtenção de 25 isolados. O marcador SAG2 revelou que 16 isolados pertenciam ao tipo clonal I e nove ao tipo III. Não

foi descrito a presença do tipo II em isolados brasileiros e o tipo I foi, surpreendentemente, isolado de galinhas assintomáticas.

A partir da descrição de novos marcadores genéticos os autores passaram a utilizar mais de um marcador na genotipagem de múltiplos “loci” do protozoário. Em estudo realizado por Dubey et al. (2007a) um total de 84 galinhas criadas livremente (34 do Estado do Pará e 50 do Rio Grande do Sul) foram avaliadas sorologicamente (MAT), por meio de bioensaio (em camundongos e gatos) e posterior genotipagem utilizando 11 marcadores. No Pará, 58,82% das galinhas foram soropositivas, sendo isolado *T. gondii* de 15 animais revelando 11 genótipos que continham diferentes combinações dos alelos I, II e III. Nenhum tipo clonal típico foi identificado e 60,7% dos camundongos inoculados morreram de toxoplasmose. No Rio Grande do Sul, 38% das aves foram soropositivas sendo obtidos 18 isolados e sete genótipos foram identificados. Destes, cinco continham diferentes combinações dos alelos I, II e III. O isolado TgCkBr 146 apresentou alelo do tipo I em todos os 11 “loci” enquanto os isolados TgCkBr 158, 161 e 164 tinham alelo tipo III para todos os marcadores. Estes isolados apresentam tipos clonais típicos do *T. gondii*, diferentemente de outros trabalhos que, no Brasil, têm identificado isolados atípicos formados por recombinações entre os tipos clonais I, II e III.

Ao estudar casos humanos de toxoplasmose congênita em Minas Gerais Carneiro et al. (2013) coletaram amostras de sangue de 178 crianças soropositivas para *T. gondii* com idade entre 31 e 86 dias, já diagnosticadas em uma triagem inicial. O isolamento do *T. gondii* foi realizado através da inoculação do material coletado em camundongos fêmeas da linhagem Swiss (bioensaio). Todos pacientes foram avaliados oftalmologicamente. A parasitemia observada foi de 15,2% que corresponde a 27 isolados obtidos do total de 178 amostras analisadas. O isolados foram denominados TgCTBr 1 a 27 e a virulência foi dividida em três diferentes grupos sendo: 14 isolados com virulência intermediária, dez virulentos e apenas dois não virulentos. Em um não foi possível obter dados. A genotipagem revelou a presença de 14 diferentes genótipos recombinantes, sete novos não descritos previamente e sete já descritos (#8, #11, #36, #41, #67, #108 e #162). Na análise estatística não houve diferença significativa entre os diferentes genótipos e retinocoroidite.

De um total de 44 isolados brasileiros obtidos de galinhas criadas livremente de seis cidades do Espírito Santo, Pena et al. (2013) detectaram 11 diferentes genótipos recombinantes (#162, #109, #14, #108, #206, #213, #214, #215, #6, #75 e #65) sendo que nenhum deles foi do tipo clonal I, II ou III. O genótipo #6 descrito no ToxoDB, também classificado como tipo BrI, foi descrito em quatro isolados de diferentes cidades, indicando

que este genótipo está bem distribuído no estado, sendo um dos mais frequentemente isolados no país. O genótipos #206, #213, #214 e #215 foram novos genótipos descritos no estudo que receberam esta denominação após submissão ao ToxoDB.

Apesar de não ser característica no Brasil a circulação do tipo II, Silva et al. (2011) conduziram um estudo com ovinos em matadouros do estado de São Paulo, por meio da genotipagem utilizando 11 marcadores genéticos. No bioensaio, 30,3% (20/66) dos soropositivos apresentaram taquizoítos ou cistos. Seis isolados foram virulentos levando os camundongos à morte entre 12 e 25 dias pós-infecção. Nove genótipos foram identificados: três já haviam sido caracterizados por outros autores, quatro foram novos genótipos recombinantes e dois isolados se apresentaram com genética muito próxima do tipo clonal II.

Ao avaliar sorologicamente, isolar e realizar genotipagem de amostras provenientes de vacas leiteiras prenhes e seus fetos, Macedo et al. (2012) no município de Presidente Getúlio, estado de Santa Catarina, observaram que 48,3% das vacas e 3,7% dos fetos foram soropositivos (RIFI ≥ 50 e ≥ 25 , respectivamente) sendo 16 (26,6%) fêmeas prenhes positivas no bioensaio. A taxa de transmissão transplacentária detectada foi de 23,3% (14/60) e a genotipagem por meio do PCR-RFLP revelou a presença do tipo II em todos os 13 marcadores utilizados no estudo.

Na Argentina, Moré et al. (2010) de dois casos de toxoplasmose animal, obtiveram os tipos clonais II e III provenientes de amostras de cangurus mantidos em um zoológico. No histopatológico as principais lesões observadas nos diferentes tecidos analisados foram meningoencefalite não supurativa com gliose focal, sateliiose e presença de grupos de taquizoítos e cistos de *T. gondii*. No bioensaio em camundongos todos os animais inoculados mostraram-se soropositivos (RIFI) e permanecerem assintomáticos até cinco meses pós-inoculação. Taquizoítos foram isolados do lavado intraperitoneal de dois camundongos inoculados com tecido cerebral e de dois com tecido muscular (diafragma) que morrem após seis meses, e identificados como tipo III.

Em Durango, no México, Dubey et al. (2009) realizaram bioensaio em camundongos com tecidos (cérebro e coração) de cães, gatos, gambás, ratos, camundongos e esquilos e genotipagem com 11 marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico). *T. gondii* foi isolado de tecidos de três de 28 cães soropositivos e cinco de oito gatos soropositivos. Nenhum foi virulento para camundongos. Cinco genótipos foram identificados como recombinantes. Dois genótipos distintos (TgCatMx1 e TgCatMx1b) foram detectados em um gato, indicando infecção mista.

Contrastando com os resultados de genotipagem encontrados por diversos autores em países da América do Sul, Richomme et al. (2009) avaliando 148 javalis na França, encontraram 26 animais soropositivos (MAT \geq 1:24). Utilizaram 60 corações para o bioensaio em camundongos e obtiveram 21 isolados. Genotipagem destes isolados de *T. gondii* por RFLP-PCR usando três marcadores genéticos (SAG1, SAG2 e GRA7), além de marcadores microssatélites, revelou o genótipo tipo II para todos os isolados.

Ao estudar casos sintomáticos e fatais de toxoplasmose, Jokelainen (2012) realizou genotipagem de amostras fixadas por formol, a fresco ou congeladas utilizando sete marcadores microssatélites (B18, TUB2, TgM-A, W35, B17, M33 e M48) na Finlândia onde 27 isolados virulentos de diferentes espécies animais, entre eles esquilos e raposas, foram do tipo II. Na Suíça, utilizando nove marcadores genéticos (SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico) em isolados de gatos (*Felis catus*) a análise revelou a presença de alelos do tipo II em todos os “loci”, exceto no marcador Apico, com alelos do tipo I. É importante salientar que estas amostras foram obtidas de casos sintomáticos e a extração do DNA foi realizada diretamente dos tecidos sem passagem ou isolamento em camundongos.

Já nos EUA, em uma propriedade em Illinois onde três galinhas caipiras apresentaram sinais neurológicos (torcicolo, dificuldade de ficar em pé e decúbito lateral), Dubey et al. (2007b) analisaram 11 galinhas e um ganso ao suspeitarem de toxoplasmose. Anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados nos 12 animais, sendo possível isolar o protozoário do cérebro, coração e músculo esquelético de todos eles. No histopatológico (HE) foram encontradas lesões cerebrais como necrose, gliose e linfocitose perivascular, além de cistos e taquizoítos. A genotipagem por PCR-RFLP usando 11 marcadores revelou alelos tipo II em todos os “loci” indicando que este isolado pertence ao tipo clonal II, predominante na América do Norte e Europa.

Ainda nos EUA, em Michigan, Dubey et al. (2012) avaliando suínos criados livremente em duas fazendas, relataram soropositividade de 90,9% (30/33 animais) por meio de ambos os testes utilizados, ELISA e MAT. *T. gondii* foi isolado de 16 soropositivos e um soronegativo e a genotipagem revelou a presença do tipo clonal II nos animais pertencentes a uma fazenda e tipo III na outra.

Na China o isolamento e a genotipagem a partir de galinhas provenientes de área rural revelou a presença do tipo I nos sete marcadores genéticos utilizados no estudo e todos os camundongos inoculados morreram, seis deles oito dias e quatro, nove dias após a inoculação. Neste estudo a sorologia (ELISA) revelou soropositividade de 53% (53/100) sendo possível a

obtenção de apenas um (4,76%) isolado de 21 galinhas utilizadas no bioensaio em camundongos (ZHAO et al., 2012).

De acordo com Lindström et al. (2008) em Uganda, anticorpos foram pesquisados em 40 galinhas, na quais 20 foram positivas para MAT (>1:20) e PCR. A genotipagem foi realizada com cinco marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB e GRA6) demonstrando uma predominância de genótipos tipo I e II, com apenas um genótipo tipo III. No entanto o tipo III foi encontrado em duas amostras com infecção mista. Esta pesquisa contrastou com outros estudos nos quais foram identificados os genótipos tipo II e III, comuns na África, Europa, América do Norte e Ásia, aonde raramente se encontra o tipo I. Também difere da América Central e do Sul onde predominam os genótipos tipo I, III e cepas recombinantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Ampliar os conhecimentos sobre a diversidade genética e realizar um mapeamento dos diferentes genótipos de *T. gondii* que ocorrem no estado de Santa Catarina.

3.2 Específicos:

Verificar a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em galinhas naturalmente infectadas, nas seis mesorregiões de Santa Catarina;

Isolar *T. gondii* a partir de amostras do cérebro e tecido muscular cardíaco de galinhas domésticas naturalmente infectadas;

Caracterizar genotipicamente *T. gondii* isolados de galinhas domésticas por meio da técnica de PCR-RFLP “multilocus”, usando-se marcadores de alta resolução;

Pesquisar, por meio do exame histopatológico (HE), formas evolutivas do parasito e lesões nos tecidos dos camundongos utilizados para o isolamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do CAV/UDESC sob protocolo 1.02/10 de 14.06.2010.

4.2 LOCAL E OBTENÇÃO DAS AVES

Foram colhidas, no período de fevereiro a dezembro de 2011, 133 amostras de sangue de galinhas (*Gallus gallus*) nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina (Figura 1): 27 da mesorregião Serrana (Lages), 30 da Oeste (Xanxerê e Marema), 18 da Sul (Criciúma e Forquilha), 16 da Norte (Itaiópolis e Mafra), 13 da mesorregião Vale do Itajaí (Rodeio) e 29 da Grande Florianópolis (Biguaçu e Palhoça). Para a seleção foram considerados como critérios: a) as aves serem criadas livremente; b) alimentarem-se diretamente no solo; c) manter contato com outros animais e d) ter idade próxima a seis meses ou mais. As aves selecionadas foram identificadas através de anilhas.



Figura 1 – Locais das colheitas de sangue de *Gallus gallus* nas seis mesorregiões e respectivas cidades do estado de Santa Catarina. 1 - Grande Florianópolis. 2 - Norte. 3 - Oeste. 4 - Serrana. 5 - Sul. 6 - Vale do Itajaí.

Fonte: Adaptado de Wikipedia.

4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

O sangue (2mL) foi obtido por venopunção da veia braquial (Figura 2A), recolhido em tubos de ensaio esterilizados, sem anticoagulante, devidamente identificados sendo mantido sob refrigeração (4 a 8°C) durante o deslocamento para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages/SC.

No laboratório, o sangue foi mantido em banho-maria (37°C) por duas horas até completa retração do coágulo e centrifugado a 1000g durante 15 minutos. Após, o soro foi

retirado com auxílio de pipetadoras utilizando ponteiras, transferido para frascos de plástico estéreis, devidamente identificados e armazenados a -20°C até realização dos exames.

4.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Os soros foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*, conforme técnica descrita por Camargo (1964) utilizando-se como antígenos taquizoítos da cepa RH do protozoário, obtidos a partir do lavado intraperitoneal de camundongos, realizado aproximadamente três dias após a inoculação, com solução heparinizada (50mL de solução salina estéril acrescentando-se 25 μL de heparina), inativados por formol 1% em estufa a 37°C durante 30 minutos, com agitação por inversão delicadamente a cada 10 minutos. Após inativação, procedeu-se a centrifugação (1500g durante cinco minutos), descarte do sobrenadante e mistura do sedimento com 2mL de PBS 1x concentrado, nova centrifugação (1500g durante dez minutos) e descarte do sobrenadante para assim misturar PBS 1x concentrado ao sedimento, seguindo-se homogeneização completa para avaliação microscópica (aumento de 400X) da concentração de taquizoítos em 10 μL de solução pipetados nos poços da própria lâmina da sorologia após secagem em estufa. As lâminas contendo o antígeno foram mantidas em temperatura ambiente, cobertas, para evitar sujidades até secaram e serem devidamente embaladas, identificadas e armazenadas em -20°C até sua utilização.

Os soros das aves foram diluídos em PBS 1x concentrado, utilizando 1:16 como ponto de corte (GALLI et al., 2008) sendo adicionados 10 μL de cada diluição das amostras de soro nos poços das lâminas contendo o antígeno. Estas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas a 37°C durante 40 minutos. Seguindo-se três lavagens das lâminas com PBS 1x concentrado a cada 10 minutos e secagem por aproximadamente oito minutos em estufa a 37°C . Na sequência, adicionou-se o conjugado anti-IgG de galinha (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.) marcado com isotiocianato de fluoresceína, repetida a incubação, três lavagens e posterior secagem das lâminas nas mesmas condições já citadas. Ao final foi adicionado glicerina tamponada e feito o recobrimento com lamínula para leitura em microscópio de fluorescência.

Foram consideradas positivas (Figura 2B) as amostras que reagiram na diluição maior ou igual 1:16 sendo submetidas a titulação por diluição sequencial, em múltiplos de quatro, até a máxima diluição reagente, ou seja, o título da amostra. Incluíram-se em todas as reações

realizadas para cada lâmina, soros padrões designados como controle positivo (TP) e controle negativo (TN) para comparação.

4.5 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Para o isolamento do parasito, por meio do bioensaio em camundongos, foram colhidas amostras de coração e cérebro de 30 galinhas sorologicamente positivas para *T. gondii* que apresentaram maiores títulos na RIFI. Correspondendo a 11 aves da mesorregião Serrana, sete da Oeste, quatro da Sul, três da Norte, duas da mesorregião Vale do Itajaí e três da Grande Florianópolis, conforme cada mesorregião onde os animais foram adquiridos e dependendo sempre da disponibilidade de venda destas por parte dos seus proprietários.

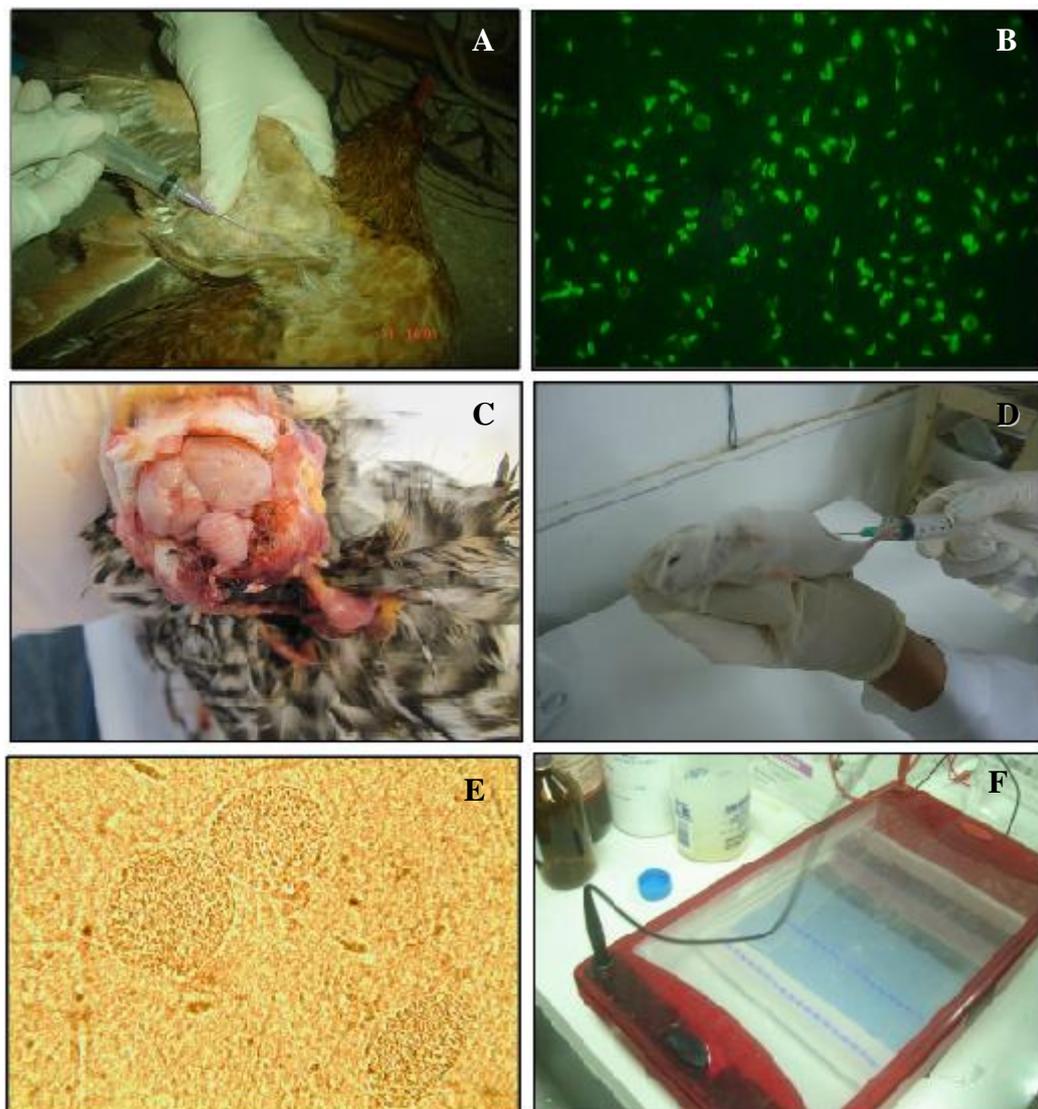


Figura 2 – Isolamento e genotipagem de *T. gondii* no estado de Santa Catarina. A - Colheita de sangue das aves. B - Sorologia por meio da RIFI. C - Necropsia das aves. D - Bioensaio em camundongos. E - Pesquisa de cisto do protozoário no cérebro dos camundongos. F - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR-RFLP.

As aves foram abatidas por deslocamento crâniocervical, conforme princípios de bioética, para a coleta do coração e do cérebro (Figura 2C) que foram acondicionados em tubos Falcon com 30mL de solução de antibióticos (2000UI de penicilina + 200µg de estreptomicina/mL) e mantidos sob refrigeração (temperatura entre 4 e 8°C) até o processamento. Cada cérebro removido foi transferido para um gral estéril onde foi macerado e homogeneizado em solução salina estéril a 0,9% e filtrado através de gaze estéril de quatro camadas. A suspensão obtida de cada cérebro foi inoculada intraperitonealmente em dois camundongos, sendo que cada animal recebeu, no mínimo, 1mL de inóculo. Os corações e/ou cérebros das aves foram digeridos em solução ácida de pepsina segundo Dubey (1998).

Para o preparo da solução de pepsina ácida suficiente para 10g de tecido, pH 1,1-1,2, utilizou-se pepsina 1:10.000 (Dinâmica[®], SP, Brasil) 0,26g, cloreto de sódio P.A. 0,5g, ácido clorídrico P.A. 37% 0,7mL e água destilada em quantidade suficiente para 50mL de solução, recém preparada, homogeneizada em becker com 50mL de solução salina (0,9% NaCl) e com tecido macerado sendo a mistura incubada em estufa a 37°C por uma hora sobre agitador magnético. Após a incubação, a suspensão foi filtrada através de duas camadas de gaze e o filtrado foi transferido para tubos de 50mL e centrifugado a 1200g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada um dos tubos foi então neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH~8,3, recém preparado (cerca de cinco mL por tubo). A neutralização foi percebida por fitas reativas de pH. Após a homogeneização, o material foi transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 45mL com salina e foi centrifugado a 1200g por 10 minutos. Mais uma vez, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado com salina contendo 2000U de penicilina e 200µg de estreptomicina/mL. Imediatamente a amostra foi inoculada intraperitonealmente em dois a cinco camundongos (Figura 2D).

Foram utilizados camundongos albinos linhagem Swiss (machos e fêmeas) com idade aproximadamente de dois meses. O bioensaio foi realizado inoculando, intraperitonealmente, os produtos da maceração e/ou digestão de cérebros e corações das galinhas, conforme descrito na Tabela 1. Em alguns camundongos optou-se por inocular o cérebro a fresco, sem submeter ao processo de digestão, apenas macerado com solução salina como uma forma de garantir a viabilidade dos cistos.

Com o objetivo de atender o critério de “redução do número de animais”, estabelecido pelas normas de bem estar animal, neste projeto trabalhamos com o mínimo possível de aves abatidas e de camundongos inoculados.

Tabela 1 - Bioensaio para isolamento de *Toxoplasma gondii* a partir de cérebro e/ou coração de aves (*Gallus gallus*) naturalmente infectadas.

Amostra (ave)	Origem – mesorregião	Inóculo	Nº de Camundongos
002	Serrana	CO+CE	05
003	Serrana	CO+CE	03
006	Serrana	CO+CE	03
008	Serrana	CO+CE	03
011	Serrana	CO+CE	03
013	Serrana	CO+CE	03
015	Serrana	CO+CE	03
018	Oeste	CO+CE	03
022	Oeste	CO+CE	03
024	Oeste	CO+CE	03
032	Sul	CO+CE	03
035	Sul	CO+CEND	04
036	Sul	CO+CE	03
038	Sul	CO+CEND	04
056	Norte	CO+CEND	04
057	Norte	CO+CEND	04
059	Norte	CO+CEND	04
063	Oeste	CO+CE	03
064	Oeste	CO+CE	03
067	Oeste	CO+CE	03
071	Oeste	CO+CE	03
087	Vale do Itajaí	CO+CE+CEND	05
089	Vale do Itajaí	CEND	05
096	Oeste	CO+CE	04
100	Oeste	CO+CE+CEND	04
102	Oeste	CO+CE	04
103	Oeste	CO+CE+CEND	04
125	Grande Florianópolis	CO+CE+CEND	04
127	Grande Florianópolis	CO+CE+CEND	04
128	Grande Florianópolis	CO+CE+CEND	04
TOTAL			108

CE: cérebro digerido; CO: coração digerido; CEND: cérebro não digerido.

Cada camundongo inoculado intraperitonealmente, e identificado individualmente com solução de ácido pícrico 2%, foi examinado diariamente visando observar a manifestação de sinais clínicos de toxoplasmose aguda (apatia, anorexia, depressão, enoftalmia e pelos arrepiados). Quando algum camundongo apresentou tais sinais, o animal foi eutanasiado e lavado peritoneal com solução salina estéril foi realizado para colheita do exsudato e análise da presença de taquizoítos de *T. gondii*.

Os camundongos que não apresentaram sinais clínicos da infecção aguda, ao completarem oito semanas pós-inoculação (PI), foram eutanasiados, de acordo com os princípios de bioética e bem estar animal, através de deslocamento crâniocervical. Destes animais foi colhido sangue para obtenção de soro e posterior pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* (RIFI). Fragmentos de cérebro (3 a 5mm²) foram comprimidos entre lâmina e lamínula (“squash”) para a pesquisa de cistos (Figura 2E).

4.6 HISTOPATOLOGIA (HE)

Amostras de diferentes órgãos dos camundongos (coração, cérebro, pulmão, músculo esquelético, fígado, baço e rim) foram coletadas e armazenadas em frascos de 50mL em solução de formol a 10% e foram enviadas para o Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC para realização de exame histopatológico com coloração hematoxilina eosina (HE) para a pesquisa de lesões e do agente.

4.7 GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii*

4.7.1 Extração do DNA

Das amostras provenientes dos camundongos que apresentaram cistos teciduais e/ou taquizoítos foi extraído DNA. O cérebro foi cuidadosamente removido e, num gral estéril, foi macerado e homogeneizado em 1mL de solução salina estéril a 0,9%. Os taquizoítos foram obtidos após lavagem intraperitoneal dos camundongos que vieram a óbito, com 1mL de solução salina estéril. O material foi então armazenado em microtubos estéreis, devidamente identificados e mantido a -20°C.

No total, 11 isolados (Ck 3, Ck 32, Ck, 35, Ck, 56, Ck 63, Ck 89, Ck 102, Ck 103, Ck 125, Ck 127 e Ck 128), provenientes do bioensaio em camundongos, foram submetidos à extração do DNA. A identificação é referente ao número da galinha.

Para a extração do DNA foi utilizado o kit de extração comercial (Easy-DNA™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram submetidas ao descongelamento em estufa a 37°C e homogeneizadas por agitação contínua no vórtex. O procedimento foi realizado de forma a evitar contaminações, em capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70° e esterilizada com irradiação ultravioleta, utilizando luvas novas e todos os materiais (microtubos, ponteiras e água ultrapura) foram autoclavados. Após a extração, o DNA foi armazenado a -20°C, até a realização da PCR.

4.7.2 PCR-RFLP

A caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* obtidos foi realizada na Universidade Estadual de Londrina (UEL) em Londrina/PR, junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Laboratório de Protozoologia desta instituição,

utilizando 12 marcadores genéticos SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3.

O “Multiplex” PCR consiste em uma técnica laboratorial para a amplificação de partes específicas do material genético. Em uma única reação vários segmentos genômicos diferentes são amplificados de acordo com os “primers” utilizados. Foram utilizados “primers” externos para amplificação de 12 marcadores genéticos conforme Tabela 2.

Uma mistura de reagentes foi utilizada na “Multiplex” PCR para uma reação de 25µL incluindo controle e amostras, sendo ela composta de 18µL de água ultrapura autoclavada, 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 0,5µL de mistura de dNTPs, 0,25µL da mistura de “primers” externos F (inicial), 0,25µL da mistura de “primers” externos R (final), 1,25µL de MgCl₂ (50mM), 0,25µL *Taq* DNA polimerase e 2µL da amostra de DNA extraído.

A “Nested” PCR foi realizada utilizando uma mistura de reagentes, composta de 16,5µL de água ultrapura autoclavada, 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 0,5µL de mistura de dNTPs, 1µL da mistura de “primers” interno F (inicial), 1µL da mistura de “primers” interno R (final), 1,25µL de MgCl₂ (50mM), 0,25µL *Taq* DNA polimerase e 2µL do produto da “Multiplex” PCR. A “Nested” PCR foi realizada uma vez para cada marcador, com seus respectivos “primers” internos (Tabela 2) para amplificação mais específica de determinado segmento para proceder a genotipagem. Os ciclos utilizados estão descritos abaixo, para “Multiplex” e “Nested”:

Fase	“Multiplex” PCR	“Nested” PCR
1. Desnaturação Inicial	95°C por 4'	95°C por 4'
2. Desnaturação	94°C por 30''	94°C por 30''
3. Hibridização	55°C por 1'	60°C por 1'
4. Extensão Inicial	72°C por 2'	72°C por 1' 30''
5. Ciclos (etapas 2 a 4)	30 ciclos	35 ciclos
6. Extensão Final	72°C por 5'	72°C por 5'
7. Manutenção	10°C	10°C

Para o controle negativo da reação foram utilizados água pura autoclavada e reagentes da PCR sem o DNA, e para controle positivo dos genótipos I, II e III foram utilizadas as cepas RH (SABIN, 1941), ME49 e VEG, respectivamente e que caracterizam as cepas padrões mantidas em camundongos no DMVP/UEL. Inicialmente as sequências alvo do DNA foram amplificadas pela “Multiplex” PCR, utilizando “primers” externos de todos os marcadores em

conjunto e, após, pela “Nested” PCR, utilizando “primers” internos individualmente para cada marcador.

Tabela 2 - Marcadores, “primers”, tamanhos de fragmentos obtidos e enzimas de restrição utilizados para genotipagem de *Toxoplasma gondii* isolados de galinhas naturalmente infectadas. Lages, 2013.

Marcador	“Primers” externos	“Primers” internos	Tam (pb)	Enzima de restrição	Referência
SAG1	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I+HaeII0,1µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 37 °C 1 h. 2,5% gel.	(GRIGG et al. 2001)
5’SAG2	F: GCTACCTCGAACAGGAACAC R: GCATCAACAGTCTCTCGTTGC	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	MboI 0,1µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 2,5% gel.	(HOWE et al. 1997; SU et al. 2006)
3’SAG2	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	HhaI 0,1µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 2,5% gel.	(HOWE et al. 1997)
SAG3	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	NciI 0,1µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 2,5% gel.	(KHAN et al. 2005; SU et al. 2006)
alt. SAG2	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTCCGACCGCGGGAGCAC	546	HinfI 0,1µL+TaqI 0,1µL, NEB3 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 30min, 65°C 30min. 2,5% gel.	(GRIGG et al. 2001)
BTUB	F: TCCAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAATGACGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI 0,1µL+TaqI 0,1µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 60°C 1 h. 2,5% gel.	(KHAN et al. 2005; SU et al. 2006)
GRA6	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI 0,2µL, NEB2 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 2,5% gel.	(KHAN et al. 2005; SU et al. 2006)
c22-8	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCCG	521	BsmAI 0,1µL+MboII 0,1µL, NEB2 2µL, BSA 0,2µL, 37 °C 30 min, 55°C 30min. 2,5% gel.	(KHAN et al. 2005; SU et al. 2006)
c29-2	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGGCATAACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV 0,2µL+RsaI 0,2µL, NEB1 2µL, BSA 0,2µL, 37 °C 1 h. 2,5% gel.	(KHAN et al. 2005; SU et al. 2006)
L358	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGC	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII 0,1µL+NlaIII 0,2µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 2,5% gel.	(KHAN et al. 2005; SU et al. 2006)
PK1	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI 0,1µL+RsaI 0,1µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 2,5% gel.	(KHAN et al. 2005; SU et al. 2006)
Apico	F: TGGTTTTAAACCCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTGAA	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCTTGATA	640	AflIII 0,2µL+DdeI 0,2µL, NEB2 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 3% gel.	(SU et al. 2006)
CS3	F: GTGTATCTCCGAGGGGTCT R: TGTGACTTCTTCGCATCGAC	F: AGCGGATTTCCAACACATGTC R: CTGCTGCATTCAAACTCC	557	MboI 0,1µL+NlaIII 0,1µL, NEB4 2µL, BSA 0,2µL, 37°C 1 h. 2,5% gel.	(PENA et al. 2008)

Posteriormente os produtos finais da “Nested” PCR foram submetidos a clivagem por meio de enzimas de restrição em condições ideais de temperatura e tempo para cada marcador (Tabela 2). O produto resultante da clivagem enzimática, total de 20µL, foi homogeneizado com 2µL de solução de azul bromofenol e submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,5 ou 3% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) uma vez, adicionado de 9µL de SYBR (Invitrogen®, Life Technologies, New York) conforme pode ser observado na Figura 2F. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital, sistema L-Pix image_ versão 1.21 Loccus Biotecnologia Brasil/SP e

fotografado. Os resultados obtidos foram comparados com os genótipos apresentados no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>) a fim de classificar os isolados obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SOROLOGIA DAS AVES

Do total de galinhas avaliadas sorologicamente por meio da RIFI para pesquisa de anticorpos da classe IgG contra *T. gondii*, 63,16% (84/133) foram positivas, sendo 22,62% (19/84) oriundas da mesorregião Serrana, 22,62% (19/84) da Oeste, 19,05% (16/84) da Sul, 15,47% (13/84) da Norte, 2,38% (2/84) da mesorregião Vale do Itajaí e 17,86% (15/84) da Grande Florianópolis. Os títulos de anticorpos foram 1:16 (28), 1:64 (31), 1:256 (21) e 1:1024 (4).

A alta soro-ocorrência observada foi interessante e válida para o estudo e pode ser explicada pelo fato de que a maioria das aves eram criadas soltas e/ou apresentavam idade superior a seis meses, além de se alimentarem diretamente no solo, o que aumenta a probabilidade da infecção por ingestão de oocistos.

Nenhuma galinha, no momento da coleta, apresentou sinais clínicos característicos de toxoplasmose e o fato de a maioria dos títulos de anticorpos da classe IgG apresentarem-se baixos, ou seja, reagirem até a diluição 1:256, pode indicar infecção crônica na população de aves analisada. Apesar disso, não foi realizada sorologia pareada para verificação de títulos crescentes e nem dosagem de IgM que caracteriza doença aguda.

O número de aves analisadas teve grande variação em relação à localização no estado, pois era feito um contato com o proprietário e a quantidade de galinhas que estes possuíam variava, assim como a disponibilidade de venda dos animais também dependia deles. O que não interferiu no estudo, pois o objetivo era obter, pelo menos, um isolado de cada mesorregião como forma de “mapeamento” dos genótipos no estado.

Nas propriedades das mesorregiões Serrana e Oeste Catarinense a alta positividade pode ser explicada pelo fato de as galinhas serem criadas livremente e em contato com gatos, o que pode indicar um alto grau de contaminação ambiental e, conseqüentemente, de positividade das aves. No Oeste a propriedade apresentava cinco gatos no momento da coleta e estes eram criados juntamente com as aves se alimentando e defecando sobre o mesmo solo.

Na mesorregião Vale do Itajaí a baixa positividade pode ser explicada pelo fato de estas serem criadas em cercados juntamente com os cães, nos canis. Além do fato de que a colheita foi realizada em três aves jovens, abaixo de seis meses de idade e a propriedade possuía em média três gatos que não tinham acesso ao canil, portanto provavelmente o local

apresentava baixa contaminação com oocistos. As três aves que apresentavam idade inferior a seis meses foram soronegativas na RIFI não sendo utilizadas no bioensaio.

A infecção pelo *T. gondii* em aves criadas livremente é considerada importante pelo fato destes animais serem bons indicadores de contaminação ambiental, por oocistos do protozoário, pois elas se alimentam diretamente do solo. Tecidos de galinhas infectadas com *T. gondii* são considerados boa fonte de infecção para gatos. No mais, a ingestão de carne de galinha contaminada pode ser uma fonte de infecção para humanos e outros animais. Raramente uma galinha com toxoplasmose irá apresentar sinais clínicos da doença por serem consideradas resistentes (DUBEY, 2010a). Fato este também observado no presente estudo.

No Brasil, como em outros países, tem-se verificado a prevalência da infecção de galinhas pelo *T. gondii* nos mais diferentes estados. GARCIA et al. (2000) no município de Jaguapitã, PR, relataram baixa soroprevalência quando comparado aos resultados descritos no estado de Santa Catarina, 10,3% entre as 155 amostras examinadas de soros de galinhas, pela reação de imunofluorescência indireta, considerando como ponto de corte o título 1:16.

No estado de São Paulo, colhendo 82 amostras de galinhas de quatro diferentes localidades, foram encontradas 32 (39,02%) amostras reagentes no método de aglutinação direta (MAD), considerando um título de 1:25 como indicativo de positividade (DUBEY et al., 2002). No estado do Paraná, estudando aves da região de Santa Isabel do Ivaí, foram encontrados 40% (16/40) aves examinadas positivas ao método de aglutinação direta, considerando como ponto de corte a diluição 1:5 (DUBEY et al., 2003).

Elevadas soropositividades, semelhantes a verificada no presente estudo, foram relatadas por Silva et al. (2003) no Rio de Janeiro avaliando sorologicamente 198 galinhas domésticas por meio do MAT e 65% (129) foram positivas, e por Dubey et al. (2006a) em Rondônia, Amazônia, onde 66% (33/50) das galinhas criadas soltas apresentaram positividade no mesmo teste.

Resultados mais recentes revelam alta soropositividade quando comparados aos resultados acima descritos. Em Fernando de Noronha, 84% (42/50) das galinhas analisadas foram soropositivas, sendo superior ao aqui relatado (DUBEY et al., 2010) e 76% (38/50) descrito por outros autores na mesma localização geográfica (COSTA et al., 2012). No Espírito Santo, 40% (196/490) sendo que na cidade de Colatina, deste estado, destaca-se a alta positividade encontrada e semelhante ao presente trabalho, 73,7% (BELTRAME et al., 2012)

De uma forma geral, pode-se observar que diversos estudos de soro-ocorrência ou soroprevalência em galinhas criadas soltas revelam altas porcentagens de positividade, o que pode estar relacionado com a facilidade desta espécie animal se infectar pelo agente, devido

aos seus hábitos alimentares. Também é importante considerar os hábitos culturais da população, o clima da região e a distribuição geográfica como fatores de risco que podem influenciar a positividade em galinhas, demais espécies animais e no ser humano, e que muitas vezes não são levados em consideração.

5.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

De um total de 84 galinhas soropositivas para *T. gondii* no presente estudo, foram processados e utilizados tecidos (cérebro e coração) de 30 para o bioensaio. Os resultados da sorologia das aves utilizadas no bioensaio e da pesquisa de anticorpos, cistos, taquizoítos e virulência para camundongos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Recíproca dos títulos de anticorpos (RIFI) contra *Toxoplasma gondii* das galinhas, número de camundongos inoculados (n), título (RIFI), formas evolutivas de *T. gondii* e virulência observadas nos camundongos nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina. Lages, 2013.

Amostra	Mesorregião	RIFI das galinhas	Camundongos			
			N	RIFI*	Isolamento (no. camundongos)**	Mortes (dias PI)
002	Serrana	1:1024	05	-	-	-
003	Serrana	1:1024	03	-	Cisto (1)	-
006	Serrana	1:64	03	-	-	-
008	Serrana	1:16	03	-	-	-
011	Serrana	1:64	03	-	-	-
013	Serrana	1:64	03	-	-	-
015	Serrana	1:256	03	-	-	-
018	Oeste	1:16	03	-	-	-
022	Oeste	1:16	03	-	-	-
024	Oeste	1:16	03	-	-	-
032	Sul	1:256	03	A/B(1:16) C(1:256)	Cisto (1)	-
035	Sul	1:256	04	A(1:64) D(1:256)	Cisto (2)	-
036	Sul	1:1024	03	-	-	-
038	Sul	1:256	04	-	-	-
056	Norte	1:256	04	C(1:64)	Cisto (1)	-
057	Norte	1:256	04	-	-	-
059	Norte	1:256	04	-	-	-
063	Serrana	1:256	03	-	Taquizoítos (3)	11
064	Serrana	1:64	03	-	-	-
067	Serrana	1:1024	03	-	-	-
071	Serrana	1:16	03	-	-	-
087	Vale do Itajaí	1:256	05	A(1:16)	-	-
089	Vale do Itajaí	1:64	05	A/B(1:16)	Cisto (2)	-
096	Oeste	1:256	04	B(1:16)	-	-
100	Oeste	1:64	04	B(1:16) C(1:64)	-	-
102	Oeste	1:64	04	A(1:256)	Cisto (1)	-
103	Oeste	1:256	04	B(1:256)	Cisto (1) e Taquizoítos (1)	19
125	Grande Florianópolis	1:256	04	D(1:16)	Cisto (1)	-
127	Grande Florianópolis	1:256	04	A2(1:256)B/C/D (1:16)	Cisto (4) e Taquizoítos (1)	11
128	Grande Florianópolis	1:64	04	A/B/C/D (1:16)	Cisto (4)	-

*A/B/C/D – letras maiúsculas indicam camundongos inoculados de cada amostra

** Os números 1, 2 3 e 4 entre parênteses são referentes ao número de camundongos, dentre os inoculados, para cada amostra, que apresentaram cistos ou taquizoítos no bioensaio

Dos 108 camundongos inoculados, 28,05% (23) soroconverteram para *T. gondii* com títulos que variaram de 16 a 256. Os 23 camundongos soropositivos e os referentes títulos na RIFI estão descritos na Tabela 3, os demais não citados foram soronegativos. Em alguns casos os camundongos apresentaram cistos no bioensaio e não soroconverteram, em outros casos foram soropositivos não sendo observados cistos. O título 1:16, utilizado como ponto de corte na RIFI, foi utilizado para detectar o maior número de camundongos soropositivos, além da pesquisa bibliográfica para verificação do uso desta referência em outros trabalhos (NAVARRO et al. 1992).

Dubey (2010b) ao estudar a toxoplasmose em roedores e pequenos mamíferos, cita que o método utilizado para a pesquisa direta ou indireta de *T. gondii* em roedores é considerado crítico, ou seja, irá contribuir para o sucesso ou o fracasso da pesquisa. O autor revela ainda que os testes sorológicos, de uma forma geral, são fáceis de realizar e que a sensibilidade e especificidade dependem do método escolhido, além da diluição do soro a ser testado. O fato de considerar baixos títulos como positivos pode caracterizar uma reação não específica.

Foram obtidos 11 isolados do protozoário, sendo oito na forma de cistos cerebrais, um na forma de taquizoítos (obtidos do lavado intraperitoneal de camundongos que adoeceram e morreram) e dois constituídos por taquizoítos e cistos.

Em alguns camundongos foi possível verificar a presença de cistos, pela técnica de “squash” e, em outros, taquizoítos obtidos no lavado intraperitoneal. Na amostra 03, material proveniente da mesorregião Serrana, verificou-se um cisto em dos três camundongos inoculados, no animal referido como 3A. Nenhum animal manifestou sinais clínicos sendo todos eutanasiados oito semanas PI e a sorologia (RIFI) foi negativa para todos os camundongos (3A, 3B e 3C). Neste caso, como foi encontrado apenas um cisto cerebral na amostra 3A no “squash” e este apresentava-se atípico. Mesmo com os animais sendo soronegativos o isolado foi submetido a genotipagem.

Na amostra 32, mesorregião Sul, numerosos cistos foram observados em um dos camundongos (32C), sendo 32A e 32B negativos no “squash”. Já na RIFI, no camundongo que apresentou cistos cerebrais (32C) o título foi de 1:256 e nos 32A e 32B, houve soroconversão (1:16) mesmo não sendo possível a visualização de cistos na técnica com material à fresco. Possivelmente esse resultado indica casos falsos negativos, pois como houve soroconversão provavelmente o animal apresentava cisto. Também é preciso considerar a baixa sensibilidade do “squash” para pesquisa de cistos cerebrais. Nenhum dos três camundongos inoculados manifestou toxoplasmose aguda sendo todos, da mesma forma

citada anteriormente, eutanasiados oito semanas PI, o que caracteriza também um isolado não virulento para a espécie. Já na amostra 35, dessa mesma mesorregião, dos quatro camundongos inoculados foram observados numerosos cistos em dois deles, 35A e 35D, com títulos de 1:64 e 1:256 na RIFI, respectivamente. Também caracterizando isolados não virulentos devido a ausência de mortalidade. O camundongos 35B e 35C foram negativos no “squash” e na RIFI.

Na mesorregião Norte catarinense, da amostra 56, inoculada em quatro camundongos no bioensaio, foi possível verificar a presença de numerosos cistos em um dos camundongos (56C) e este apresentou sinais neurológicos (incoordenação, “head-tilt” e andar em círculos) e título de 1:64 na RIFI. Era esperado um título de anticorpos contra *T. gondii* superior ao encontrado devido ao fato de o animal apresentar sinais clínicos neurológicos, típicos da toxoplasmose. O animal manteve-se vivo até o final das oito semanas PI, quando então foi eutanasiado. Os demais camundongos, 56A, 56B e 56D foram negativos na pesquisa do protozoário, na sorologia e no “squash”, além de não manifestaram sinais clínicos durante os dois meses de avaliação.

Nos camundongos inoculados com material proveniente de aves da mesorregião Serrana (amostra 63), os três animais apresentaram sinais clínicos (apatia, anorexia, depressão, enoftalmia/desidratação e pelos arrepiados), desenvolveram a doença de forma aguda e morreram aos 11 dias PI, dos quais foi possível coletar uma quantidade razoável de taquizoítos. O que caracterizou um isolado virulento, pois causou 100% de mortalidade nos animais inoculados. Uma parte do material foi armazenada para posterior extração de DNA, porém sem sucesso devido, provavelmente, a baixa concentração do material genético. A outra parte foi inoculada em outros dois camundongos para manutenção do isolado. Inicialmente, os camundongos manifestaram a mesma sintomatologia e morreram em aproximadamente 11 dias, ou mesmo antes disto (com cinco a sete dias já se observava mortalidade). A medida que eram realizadas as reinoculações, sempre em dois animais, eles demoravam mais a morrer até ao ponto de não haver mais óbitos. Provavelmente a cepa perdeu a virulência fato que também pode ser explicado observando a consequente diminuição da concentração de taquizoítos no lavado até a ausência destes ao longo das reinoculações.

Na amostra 89, mesorregião Vale do Itajaí, dos cinco camundongos inoculados, dois apresentaram cistos (89D e 89E) e estes não soroconverteram (RIFI). Fato inesperado, pois os animais 89A e 89B apresentaram títulos de 1:16 na RIFI, porém sem a observação de cistos no SNC. Uma explicação poderia ser referente as técnicas utilizadas, RIFI e “squash”, ou

devido à resposta imune individual do hospedeiro. O isolamento de *T. gondii* a partir de roedores soronegativos capturados em Umuarama, PR, foi relatado por Araújo et al. (2010). Neste estudo os autores realizaram sorologia (MAT 1:10) de 43 roedores silvestres (*Mus musculus* e *Rattus rattus*) e todos foram soronegativos e, a despeito dos resultados da sorologia, obtiveram dois isolados não virulentos caracterizados como recombinantes na análise “multilocus”, a partir do bioensaio em camundongos. Assim, pode-se inferir que mesmo o animal apresentando-se soronegativo ele pode está infectado pelo protozoário e apresentar cistos teciduais. O camundongo 89C morreu seis dias após a inoculação e não foram observados taquizoítos no lavado intraperitoneal, apenas alta concentração de bactérias o que pode ter sido a causa da morte por septicemia. Deste animal não foi possível coletar sangue para RIFI e o lavado foi desconsiderado e não reinoculado.

Um camundongo da amostra 102, proveniente da mesorregião Oeste catarinense, apresentou inúmeros cistos, Este animal, denominado de 102A, além da presença de cistos cerebrais, foi soropositivo com título de 1:256 na RIFI. Os demais, 102B, 102C e 102D foram soronegativos e também não apresentaram formas evolutivas do *T. gondii* (cistos) por meio do “squash”. Nenhum dos quatro camundongos inoculados com material proveniente dessa mesorregião apresentou sinais clínicos sendo todos eutanasiados oito semanas PI, conferindo ao isolado característica de não virulência para camundongos. Na amostra 103 (Oeste) um camundongo “103A” apresentou sinais clínicos compatíveis com a toxoplasmose aguda, apatia, anorexia, desidratação e enoftalmia, pelos arrepiados e abaulamento abdominal, e morreu 19 dias após a inoculação sendo possível isolar taquizoítos do lavado intraperitoneal em quantidade pouco expressiva. Devido à baixa concentração de taquizoítos, e pequeno volume do lavado intraperitoneal recuperado, optou-se por não reinocular o material e armazenar para extração do DNA. Também não foi coletado sangue para RIFI, pois o animal já estava morto. O camundongo 103B, assintomático, apresentou cistos no “squash” e título de 1:256 na RIFI. Os demais, 103C e 103D, também assintomáticos, foram negativos no “squash” e RIFI. Neste isolado a taxa de mortalidade foi de 25% (1/4) para os camundongos.

Na mesorregião Grande Florianópolis, da amostra 125, foi possível isolar inúmeros cistos de um camundongo (125D) que apresentou título de 1:256 na RIFI. Os animais 125A, 125B e 125C foram descartados, pois morreram dois dias após a inoculação, sem a recuperação de taquizoítos no lavado intraperitoneal. Provavelmente alguma complicação durante a inoculação causou a mortalidade destes camundongos. O isolado, a partir de cistos cerebrais, foi considerado como não virulento. Na amostra 127, da mesma mesorregião, um camundongo (127A) manifestou sinais clínicos como apatia, anorexia, desidratação e

enofthalmia além de pelos arrepiados e abaulamento abdominal e morreu 11 dias PI e do qual, primeiramente, foram isolados taquizoítos na lavado intraperitoneal, sendo uma parte reinoculada em outro camundongo, denominado 127A2, como tentativa de manutenção da cepa, o qual apresentou cistos cerebrais e título de anticorpos de 1:256. Os outros três camundongos (127B, 127C e 127D) da amostra também apresentaram cistos e título de 1:16 na RIFI. Devido a baixa concentração de taquizoítos observados no lavado intraperitoneal do camundongo 127A, provavelmente o animal reinoculado (127A2) desenvolveu imunidade contra *T. gondii* e manifestou a forma crônica da doença. A taxa de mortalidade foi de 25% (1/4) dos camundongos inoculados. Na amostra 128, os quatro camundongos (128A, 128B, 128C e 128D) apresentaram cistos cerebrais e título de 1:16 na RIFI, sendo que nenhum manifestou sinais clínicos e sobreviveram até finalizar oito semanas PI, caracterizando o isolado 128, proveniente da mesorregião Grande Florianópolis, como não virulento.

Em alguns camundongos, amostras 87 (Vale do Itajaí), 96 e 100 (Oeste), houve positividade somente na RIFI, sem a observação de cistos ou taquizoítos. Estes animais não manifestaram sinais clínicos de toxoplasmose, permaneceram vivos até o final das oito semanas PI sendo eutanasiados para coleta dos tecidos e sangue. O material foi armazenado mas não utilizado na genotipagem.

Ao total, foram utilizados 108 camundongos para o bioensaio, dependendo do total de inóculo obtido em cada digestão. Destes, através do “squash” observaram-se cistos contendo bradizoítos no cérebro da maioria dos camundongos, com manifestação da doença na forma crônica.

Apenas em três isolados (63, 103 e 127) os animais manifestaram doença na forma aguda e foi possível isolar taquizoítos no lavado intraperitoneal destes, sendo a taxa de mortalidade variável. O baixo número de taquizoítos presentes no lavado e a dificuldade em manter a cepa, através das passagens em camundongos, provavelmente tem relação com o genótipo do protozoário, característico das cepas de baixa virulência, visto demorar um tempo considerável para causar a doença e /ou a morte do animal, e com baixa recuperação de taquizoítos. Nos isolados em que foram obtidos taquizoítos (amostra 63 e 127) estes foram reinoculados em um ou dois outros camundongos para manutenção da cepa através das passagens nesta espécie animal, não sendo possível a manutenção dos isolados por este método. O isolado 63 foi o que se mostrou mais virulento, causando a morte de todos os camundongos inoculados.

Dos 11 isolados obtidos a partir do bioensaio somente três foram considerados virulentos para camundongos, causando a morte dos animais entre 11 e 19 dias PI (amostras

63, 103 e 127), indicando uma baixa taxa de mortalidade para os animais. Esses resultados foram inesperados quando comparados com os demais isolados obtidos no Brasil, nas diferentes unidades da federação, nos quais se destacam as altas taxas de mortalidade e a virulência para camundongos, levando-os à óbito em poucos dias PI (DUBEY et al., 2007a; DUBEY et al., 2008; FERREIRA et al., 2011; PENA et al., 2006; RAGOZO et al., 2010; SOARES et al., 2011; SU et al., 2006; PENA et al., 2008;).

O que difere dos outros países da Europa e América do Norte onde os isolados apresentam baixa ou nenhuma virulência para os camundongos. Em Portugal, Dubey et al. (2006c) confirmaram a presença do genótipo tipo II, caracteristicamente isolado na Europa. No estudo, os autores isolaram *T. gondii* de tecidos de 16 galinhas e nenhum camundongo adoeceu ou morreu, caracterizando a presença de isolados não virulentos neste país.

Já no Brasil, são relatados resultados semelhantes aos do presente estudo por Soares et al. (2011) ao estudarem 22 isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas de vida livre no Pantanal/MS. Ao total, cinco isolados foram virulentos para camundongos com taxas de mortalidade de até 100%. Em sete Estados nordestinos (Pernambuco, Rio Grande do Norte, Maranhão, Bahia, Ceará, Sergipe e Alagoas) Oliveira et al. (2009) isolaram *T. gondii* de 23 galinhas assintomáticas e apenas cinco isolados foram virulentos para camundongos, levando-os à morte por pneumonia entre 12 e 25 dias pós-inoculação, confirmando a circulação de *T. gondii* virulento para camundongos em hospedeiros assintomáticos, fato também observado no presente estudo. Pena et al. (2008) no estado de São Paulo relataram baixas taxas de mortalidade para camundongos nos municípios de Pirassununga e Araçatuba. Já nas cidades de Guaíra, Ribeirão Preto, Osasco, São Paulo, Marília e Espírito Santo do Pinhal houve ausência de mortalidade nos inoculados, caracterizando isolados não virulentos.

Recentemente, no Rio Grande do Norte, região nordeste brasileira, Andrade et al. (2013) descreveram resultados discrepantes dos expostos no presente trabalho. Os autores realizaram 67 bioensaios em camundongos a partir de material proveniente de caprinos, ovinos, suínos e galinhas, obtendo 19 isolados. Destes, 17 (89,5%) foram considerados virulentos para camundongos causando morte entre nove e 25 dias PI e 100% de mortalidade nos animais inoculados. Apenas dois (10,5%) foram classificados como não virulentos.

Das 30 galinhas utilizadas no presente estudo, foram obtidos 11 isolados, o que representa uma positividade de 36,66% no bioensaio em camundongos. A baixa porcentagem pode estar relacionada com o tempo para aperfeiçoar a técnica do bioensaio e adaptar as condições de trabalho nos laboratórios utilizados para a realização do estudo. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores que utilizaram os mesmos modelos animais

(ANDRADE et al., 2013; BRANDÃO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; PEIXOTO e LOPES, 1990; SOARES et al., 2011). Positividades superiores de isolamento, por meio do bioensaio em camundongos, foram relatadas por outros autores (AIGNER et al., 2010; BELTRAME et al., 2012; COSTA et al., 2012; VAUDAUX et al., 2010) chegando a valores de 94,7% de positividade (DUBEY et al., 2007a).

A mesorregião Serrana foi o local com maior número de bioensaios bem sucedidos. Optou-se por iniciar as colheitas neste local, na cidade de Lages, pela facilidade de locomoção. Inicialmente foi preciso adaptar a técnica de bioensaio o que explica uma segunda etapa do trabalho realizado nesta mesorregião e, portanto, a maior quantidade.

5.3 RESULTADOS DO HISTOPATOLÓGICO

No exame histopatológico dos tecidos dos camundongos as lesões consistiram de infiltrados de macrófagos, focal a multifocal, leve a acentuado, no pulmão (12/108), fígado (12/108), músculo esquelético (11/108), coração (06/108), rim (04/108), SNC (04/108) e baço (03/108). Cistos contendo bradizoítos (Figura 3) foram observados no SNC (8/108), pulmão (7/108), baço (3/108), coração (2/108), fígado (2/108) e músculo esquelético (2/108); e taquizoítos livres no baço (2/108), fígado (2/108), pulmão (1/108), músculo esquelético (1/108) e SNC (1/108). Em algumas áreas essas lesões eram associadas a infiltrado, focal a multifocal, moderado de neutrófilos no fígado (5/108), pulmão (1/108) e músculo esquelético (1/108). Ainda foram verificadas áreas multifocais de necrose no pulmão (6/108), músculo esquelético (6/108), SNC (3/108), fígado (2/108), coração e baço (1/108) além de fibrose (2/108), calcificação (3/108) e regeneração de fibra esquelética (3/108).

As formas evolutivas de *T. gondii* observadas nos tecidos dos camundongos inoculados estão listadas na Tabela 4. Do total de camundongos inoculados (108) apenas 13 apresentaram cistos e/ou taquizoítos no exame histopatológico. Este fato pode estar relacionado com a técnica empregada, na qual os cortes são realizados em uma pequena parcela do tecido, muitas vezes sem a lesão, significando um falso negativo o que indica ser este um teste de baixa sensibilidade.

Tabela 4 – Relação do número de camundongos inoculados (bioensaio) e a presença das formas evolutivas de *T. gondii* observadas no exame histopatológico, nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina. Lages, 2013.

Amostra	Mesorregião	Camundongos inoculados (n)	Histopatológico (no. camundongos)
002	Serrana	5	Cistos e taquizoítos (1)
003	Serrana	3	-
006	Serrana	3	-
008	Serrana	3	-
011	Serrana	3	-
013	Serrana	3	-
015	Serrana	3	-
018	Oeste	3	-
022	Oeste	3	-
024	Oeste	3	-
032	Sul	3	-
035	Sul	4	Cistos (1)
036	Sul	3	-
038	Sul	4	Cistos e taquizoítos (1)
056	Norte	4	-
057	Norte	4	-
059	Norte	4	-
063	Serrana	3	-
064	Serrana	3	-
067	Serrana	3	-
071	Serrana	3	-
087	Vale do Itajaí	5	Cistos (1)
089	Vale do Itajaí	5	-
096	Oeste	4	Cistos (1)
100	Oeste	4	Cistos (2)
102	Oeste	4	Cistos (1)
103	Oeste	4	Cistos (2)
125	Grande Florianópolis	4	Cistos e taquizoítos (2)
127	Grande Florianópolis	4	Cistos (1)
128	Grande Florianópolis	4	-

Dos isolados em que foi possível realizar a genotipagem, na amostra 32 foi isolado cisto em cérebro no bioensaio (“squash”), porém não foram visualizadas estruturas compatíveis com *T. gondii* no histopatológico. Na amostra 35, além da presença de cistos cerebrais detectados pelo “squash”, foi verificada a presença de cistos no músculo esquelético e SNC, utilizando HE, acompanhados de infiltrado inflamatório e necrose. Nas amostras 56 e 89 foram observados cistos cerebrais somente no “squash”. Na amostra 102, foram observados cistos no cérebro (“squash”) e também no pulmão e SNC, por meio da HE. Da amostra 103, cistos e taquizoítos foram verificados no “squash” e, no HE, detectados cistos em coração, pulmão e SNC. Da amostra 125, cisto (SNC) foi observado no “squash” e, na HE, cistos e taquizoítos em baço e fígado. Na amostra 127, cistos e taquizoítos foram detectados no “squash” e cistos, na HE, no pulmão e no SNC e, na amostra 128, cistos foram verificados somente no “squash”. Já das amostras 38, 87, 96 e 100, que não foram submetidas a genotipagem encontrou-se cistos e taquizoítos no HE sendo o “squash” negativo

Houve maior ocorrência de cistos que taquizoítos, nos diferentes órgãos, com maior afinidade do protozoário pelo SNC (Figura 3), pulmão, baço, coração, fígado e músculo

esquelético (em ordem de tropismo pelo órgão). No rim não foram detectadas formas evolutivas do parasito nos camundongos inoculados.

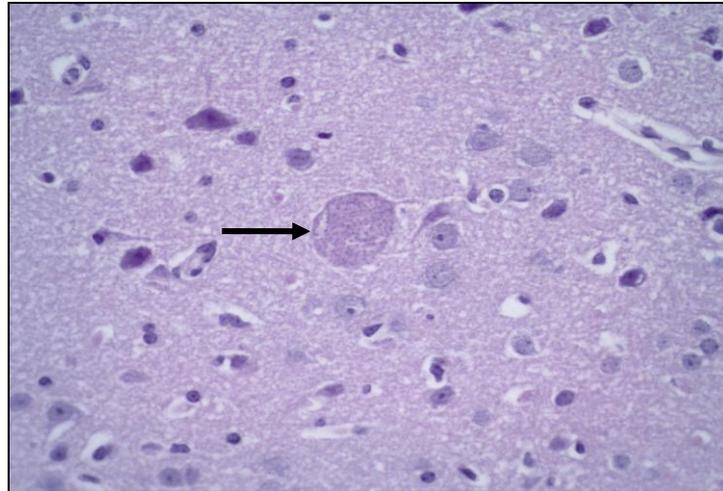


Figura 3 - Fotomicrografia de cérebro de camundongo contendo cisto de *Toxoplasma gondii* (seta – aumento de 400X).

Em muitos casos, nos diferentes órgãos analisados, a presença do cisto tecidual era acompanhada de reação inflamatória crônica, ou seja, infiltrado de macrófagos, o que pode refletir algum grau de resposta celular individual contra o protozoário.

5.4 PCR-RFLP

Na figura 4 pode-se visualizar o produto final da amplificação do DNA pelo marcador L358, com o padrão molecular (PM) de 100 pares de base (pb), utilizado para comparação, as amostras numeradas de um a 12, o controle negativo da reação (C-) e as cepas padrões tipo I (RH), II (ME) e III (VEG) também usadas para comparação a partir do padrão das bandas do material genético.

Dos 11 isolados obtidos foi possível a identificação de seis diferentes genótipos de *T. gondii* por meio da PCR-RFLP (Tabela 5). Entre os isolados caracterizados, nenhum apresentou tipo clonal I, II ou III bem definido ou clássico, sendo todos identificados como atípicos, recombinantes das três linhagens. Recentemente, esta característica dos isolados brasileiros se apresentarem como “recombinantes” vem sendo descrita por diversos autores que, ao realizarem análise “multilocus” com diferentes marcadores genéticos, passaram a identificar uma maior variabilidade do protozoário no país (DUBEY et al. 2011; FERREIRA

et al., 2011; FRAZÃO e TEIXEIRA et al. 2011; MURADIAN et al. 2012; SOARES et al., 2011).

Esses genótipos considerados atípicos, denominados por Sibley et al. (2009) como “novas variantes”, podem surgir devido à mutações somáticas, resultar da recombinação sexual entre as três linhagens clonais (Tipo I, II e III) ou, ainda, representar inteiramente novos genótipos.

Os isolados provenientes das amostras 63 e 125 não foram caracterizados, pois não foi possível a amplificação de todos os marcadores, sendo designados como “nd” na Tabela 5, entretanto foi realizada a PCR-RFLP 18S rDNA para diferenciar de outros Apicomplexas (*Neospora* spp. e *Sarcocystis* spp.) e estes foram confirmados como *T. gondii*. Uma possível explicação para a não caracterização destes isolados seria uma baixa concentração de material genético.



Figura 4 – Genotipagem por PCR-RFLP de *Toxoplasma gondii* isolados de *Gallus gallus* naturalmente infectados. Análise de restrição de produtos amplificados do “locus” L358 em gel de agarose 2,5% com as endonucleases *Hae*III e *Nla*III.

Os dados obtidos da genotipagem “multilocus” de *T. gondii* por PCR-RFLP foram analisados pelo ToxoDB, o qual apresenta informações de genotipagem de isolados do protozoário por diversos autores e em diferentes regiões do mundo. Desta forma foi possível a verificação de genótipos já existentes e de novos genótipos. Foram identificados três novos genótipos, denominados de NEO1, NEO2 e NEO3, e três genótipos já encontrados e caracterizados por outros autores, denominados de #26, #120 e #53.

Tabela 5 - Genotipagem de “multilocus” de *Toxoplasma gondii* isolados de galinhas (*Gallus gallus*) por PCR-RFLP.

Galinha	Mesorregião	Marcadores Genéticos											Genótipo*	Referências**	Espécie animal	Localização***	
		SAG1	3'-5'-SAG2	alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	Apico					CS3
32	Sul	II/III	III	III	III	III	III	I	III	III	I	III	III	#26	1, 2, 3	Gato Galinha	SP RS
35	Sul	II/III	III	III	III	III	III	I	III	III	I	III	III	#26	1, 2, 3	Gato Galinha	SP RS
56	Norte	u-1	I	II	III	III	III	III	III	III	III	III	III	NEO1			
63	Serrana	u-1	I	nd	III	nd	III	u-1	nd	I	nd	I	nd	-			
89	Vale do Itajaí	I	III	III	III	III	III	I	I	III	III	III	II	#120	4,5	Gato	PR
102	Oeste	I	III	III	III	III	III	I	I	III	III	III	II	#120	4, 5	Gato	PR
103	Oeste	u-1	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	III	#53	7, 8	Galinha Cão	PR SP
125	Grande Florianópolis	II/III	nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	III	nd	III	nd	-			
127	Grande Florianópolis	u-1	I	II	III	III	II	u-1	III	III	III	I	II	NEO2			
128	Grande Florianópolis	u-1	I	II	III	III	III	III	III	III	III	III	III	NEO3			
128	Grande Florianópolis	u-1	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	III	#53	7, 8	Galinha Cão	PR SP
128	Grande Florianópolis	I	III	III	III	III	III	I	I	III	III	III	II	#120	4, 5	Gato	PR

*Genótipo de acordo com ToxoDB

nd=nãodeterminado

**1 Pena et al. 2006; 2 Pena et al. 2008; 3 Dubey et al. 2007a; 4 Dubey et al. 2004; 5 Su et al. 2006; 7 Dubey et al. 2008; 8 Dubey et al. 2007c

*** SP = São Paulo; RS = Rio Grande do Sul; PR = Paraná

Na amostra 128, oriunda da mesorregião Grande Florianópolis, verificaram-se três genótipos diferentes: NEO3, #53 e #120, em uma galinha, o que caracteriza uma infecção mista. Uma possível explicação para isto poderia ser o histórico de circulação em diferentes propriedades distantes entre si ou, ainda, esta ave estar sujeita a diferentes fontes de infecção em uma mesma propriedade. Outros autores que também relataram infecção mista nesta mesma espécie foram Dubey et al. (2006c) que identificaram quatro isolados (TgCkNi2, 7, 46 e 47) e Lindström et al. (2008). A presença da infecção mista também foi relatada por Dubey et al. (2009) que denominaram os isolados de TgCatMx1 e TgCatMx1b, em um gato.

O genótipo #26 foi previamente identificado por outros autores em gatos e galinhas no Brasil, o que demonstra a importância desses animais (galinhas) como reservatório. Este genótipo (#26) foi identificado somente em aves provenientes da mesorregião sul de SC. Das aves 32 e 35, 100% (3/3) e 50% (2/4) dos camundongos inoculados, respectivamente, soroconverteram. No bioensaio foram obtidos somente cistos e não foi verificada mortalidade (Tabelas 3 e 4). No histopatológico somente a amostra 35 revelou a presença de cistos em um camundongo. Este genótipo, não virulento para camundongos, de acordo com o ToxoDB, foi identificado em gatos (TgCatBr65 e TgCatBr66) em São Paulo, na cidade de Osasco (PENA et al., 2006; PENA et al., 2008) e em galinhas (TgCkBr149, TgCkBr150, TgCkBr152 e TgCkBr157) no Rio Grande do Sul (DUBEY et al., 2007a). O fato de o mesmo genótipo recombinante ter sido encontrado em três regiões geográficas distintas e em diferentes espécies animais revela que sua distribuição na população pode não ser limitada pela distância ou hospedeiros, embora no estado de Santa Catarina sua distribuição está limitada a mesorregião sul.

O genótipo #120 obtido de galinhas das mesorregiões do Vale do Itajaí (Amostra 89), do Oeste (Amostra 102) e da Grande Florianópolis (Amostra 128), do presente estudo, parece estar bem distribuído no estado. Da ave 89, 40% (2/5) dos camundongos inoculados soroconverteram. Da amostra 102, apenas 25% (1/4) enquanto da 128, 100% (4/4) dos camundongos foram soropositivos na RIFI. No bioensaio foram obtidos cistos nas três amostras e não foi verificada mortalidade. No histopatológico somente a amostra 102 revelou a presença de cistos em um camundongo. No Paraná, Dubey et al. (2004) descreveram o mesmo genótipo em gatos, denominaram-no de TgCatBr20 e, ao contrário do observado no presente estudo, este foi considerado virulento para camundongos. Posteriormente, Su et al. (2006) também descreveram a presença do mesmo genótipo em gatos, e este foi virulento.

O genótipo #53, obtido a partir de aves pertencentes as mesorregiões Oeste (Amostra 103) e Grande Florianópolis (Amostra 128), foi previamente descrito em galinhas

(TgCkBr96) no Paraná (DUBEY et al., 2008) e por Dubey et al. (2007c) em cães de São Paulo (TgDgBr14 e TgDgBr15). Das aves 103 e 128, 25% (1/4) e 100% (4/4) dos camundongos inoculados, respectivamente, soroconverteram. No bioensaio foram obtidos cistos e taquizoítos na amostra 103 e 25% de mortalidade para camundongos e somente cistos com ausência de mortalidade na 128. No histopatológico amostra 103 revelou a presença de cistos em dois camundongos.

No genótipo NEO1, identificado em uma ave (56) proveniente da mesorregião norte catarinense, apenas 25% (1/4) dos camundongos inoculados soroconverteram. No bioensaio foram obtidos somente cistos em um camundongo e não foi verificada mortalidade. No histopatológico não foram observadas formas evolutivas de *T. gondii*.

O genótipo NEO2, referente a ave 127 da mesorregião Grande Florianópolis, resultou em 100% de soroconversão e, dos camundongos inoculados, foram obtidos cistos teciduais (bioensaio e HE) e taquizoítos (bioensaio) conforme Tabelas 3 e 4. Nesta amostra um camundongo (127A) manifestou sinais clínicos (apatia, anorexia, desidratação, enoftalmia, pelos arrepiados e abaulamento abdominal) e morreu 11 dias PI do qual foram isolados taquizoítos na lavado intraperitoneal. Parte destes taquizoítos foram reinoculados em outro camundongo (127A2) que apresentou cistos cerebrais e título de anticorpos de 1:256. Os outros três camundongos (127B, 127C e 127D) da amostra também apresentaram cistos e título de 1:16 na RIFI. Devido a baixa concentração de taquizoítos observados no lavado intraperitoneal do camundongo 127A, provavelmente o animal reinoculado (127A2) desenvolveu imunidade contra *T. gondii* e manifestou a forma crônica da doença. A taxa de mortalidade foi de 25% (1/4) dos camundongos inoculados. Já no NEO3 referente a ave 128, mesorregião Grande Florianópolis, 100% (4/4) dos animais soroconverteram e todos os camundongos inoculados apresentaram cistos no bioensaio dessem causar mortalidade. No histopatológico nenhum camundongo apresentou formas evolutivas de *T. gondii*.

Através dos resultados da genotipagem verificou-se uma predominância de alelos tipo III (Tabela 5), que caracterizam cepas isoladas de animais assintomáticos, de menor virulência para camundongos e que normalmente evoluem para a forma crônica da doença, com a formação de cistos teciduais, como observado no presente estudo.

Os primeiros estudos de genotipagem de *T. gondii* eram embasados em apenas um único marcador genético, SAG2. Os resultados baseados em somente um “locus” não permitiam a observação de isolados recombinantes, o que reduzia a sensibilidade/especificidade. Estudos atuais estão utilizando 11 marcadores genéticos (SAG1,

SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3) permitindo verificar genótipos recombinantes (variabilidade genética) do protozoário e conferindo maior acurácia quando se encontram cepas típicas I, II e III.

No Brasil, recentemente, amostras isoladas de humanos e analisadas por RFLP-PCR “multilocus” revelaram diversos isolados não-típicos o que evidencia a recombinação entre os alelos (ANDRADE et al., 2013; BELTRAME et al., 2012; CARNEIRO et al., 2013; DUBEY et al., 2010; PENA et al., 2013;). O parasito que foi até então considerado como clonal, com baixa diversidade genética, após realização de estudos com isolados provenientes de animais e humanos de distintas regiões geográficas, revelou uma alta variabilidade genética em relação ao relatado anteriormente demonstrando, assim, que isolados de *T. gondii* do Brasil são geneticamente diferentes daqueles da América do Norte e da Europa (PENA et al., 2008).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

Existe variação genotípica entre os isolados de *T. gondii* obtidos em Santa Catarina;

Diferenças na virulência foram observadas nos isolados das distintas regiões;

A partir do bioensaio em camundongos foi observada uma baixa taxa de mortalidade nos animais;

O resultado da genotipagem por meio da PCR-RFLP identificou a presença de seis diferentes genótipos, todos recombinantes;

Galinhas domésticas criadas soltas são boas indicadoras da contaminação ambiental com oocistos do protozoário;

O coração e cérebro são bons tecidos para a recuperação do protozoário no bioensaio;

Através da genotipagem concluiu-se que os alelos I, II e III estão distribuídos na população de galinhas no estado e que recombinações destes alelos demonstram a ampla diversidade.

7. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3. ed. Washington. D.C.: Organización panamericana de la salud, 2003.

AIGNER, C.P.; DA SILVA, A.V.; SANDRINI, F.; DE SÁ OSÓRIO, P.; POIARES, L.; LARGURA, A. Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 7, p. 935–937, 2010.

ANDRADE, M.M.C.; PINHEIRO, B.V.; CUNHA, M.M.; CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE, V.F.; VITOR, R.W.A. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Research in Veterinary Science*, In press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.006>, 2013.

ARAÚJO, J.B.; SILVA, A.V.; ROSA, R.C.; MATTEI, R.J.; SILVA, R.C.; PEREIRA, V.B.R.; LANGONI, H. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 174, n. 3-4, p. 328-331, 2010.

BELTRAME, M.A.V.; PENA, H.F.J.; TON, N.C.; LINO, A.J.B.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; PEREIRA, F.E.L. 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.

BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 8, p. 935-946, 2009.

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. 2, p. 143–149, 2006.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 06, n. 3, p. 117-118, 1964.

CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.L.; PINHEIRO, B.V.; SANTOS, D.V.V.; FERREIRA, A.M.; SU, C.; JANUÁRIO, J.N.; VITOR, R.W.A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 901-907, 2013.

COSTA, D.G.C.; MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.S.A.; SANTANA, S.C.; MAGALHÃES, F.J.R.; LIMA FILHO, C.D.F.; RIBEIRO, V.O.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; DUBEY, J.P.; SILVA, J.C.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 98, n. 3, p. 679-680, 2012.

DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, Limoges, v. 1, n. 40, p. 57-63, 2004.

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, 1998.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses and Public Health*, v. 57, n. 1, p. 60-73, 2010a.

DUBEY, J.P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2. ed. Maryland: Boca Raton, 2010b.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D.H; BLACKSTON, C.R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S.M.; RAGOZO, A.M.A.; NISHI, S.M.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; THULLIEZ, P. 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.1, p.99-105, 2002.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; GRAHAM, D.H.; DAHL,E.; FREIRE, R.L.; PRUDENCIO, L.B.; SREEKUMAR, 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.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H.N.; VIANNA, M.C.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

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

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N.C.; LUNA, L.A.; RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J.B.; KWOK, O.C.H.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. *Veterinary Parasitology*, v. 142, n. 1-2, p. 47-53, 2006b.

DUBEY, J. P.; VIANNA, M.C.; SOUSA, S.; CANADA, M.; MEIRELES, S.; CORREIA DA COSTA, J.M.; MARCET, P.L.; LEHMANN, T.; DARDÉ, M.L.; THULLIEZ, P. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Portugal. *Journal of Parasitology*, v. 92, n.1, p.184-186, 2006c.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H.; FARIAS, N.A. de R.; RUAS, J.L.; DOS SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Veterinary Parasitology*, v. 143, n. 2, p. 182-188, 2007a.

DUBEY, J.P.; WEBB, D. M.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C.; SU, C. Endemic avian toxoplasmosis on a farm in Illinois: clinical disease, diagnosis, biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*), and a goose (*Anser anser*). *Veterinary Parasitology*, v. 148, n. 3-4, p. 207-212, 2007b.

DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M.C.B.; BANDINI, L.M.; YAI, L.E.O.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 93, n. 1, p. 60-64, 2007c.

DUBEY J.P.; VELMURUGAN, G.V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H.F.J.; OLIVEIRA, L.M.; LEIFER, C.A.; GENNARI, S.M.; OLIVEIRA, L.M.G.B. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 157, n. 3-04, p. 299-305, 2008.

DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G.V.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; RODRIGUEZ-PENA, S.; MARTÍNEZ-GARCÍA, S.; GONZÁLEZ-HERRERA, A.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *Journal of Parasitology*, v. 95, n. 2, p. 319-322, 2009.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; QU, D.; SU, C.; VARVULO, M. F. V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. 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.; PASSOS, L.M.F.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L.R.; GENNARI, S.M.; SU, C. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from guinea fowl (*Numida meleagris*) and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 97, n. 5, p. 842–845, 2011.

DUBEY, J.P.; HILL, D.E.; ROZEBOOM, D.W.; RAJENDRAN, C.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.H., SU, C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Veterinary Parasitology*, v. 188, n. 1-2, p. 14-18, 2012.

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, n. 2, p. 190–195, 2011.

FIALHO, C.G.; TEIXEIRA, M.C.; ARAUJO, F.A.P. Toxoplasmose animal no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 1, p. 1-23, 2009.

FREYRE, A.; CORREA, O.; FALCON, J.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M.; VENZAL, J. M. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. *Parasitology Research*, v. 87, n. 11, p. 941-944, 2001.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J.P.; GRIGG, M.E.; DE OLIVEIRA, F.C.R. 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, 2011.

FUENTES, I.; RUBIO, J.M.; RAMIREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 1566-1570, 2001.

GALLI, S.; BELINATO, F. C.; LUCAS, T. M.; SILVA, R. C.; LANGONI, H.; Da SILVA, A.V. Infecção de frangos domésticos (*Gallus gallus*) com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*. *Veterinária e Zootecnia*, v. 15, n. 3, p.542-550, 2008.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; MARANA, E.R.M. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, v.30, n.1, p.123-127, 2000.

GRIGG, M.E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J.C. MARGOLIS, T.P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

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.

HOWE, D. K.; HONORE, 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.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Pesquisa Pecuária Municipal 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=73>> Acesso em: 27 set. 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo demográfico 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/calendario.shtm>> Acesso em: 27 set. 2012.

JOKELAINEN, P. 2012. Endemic *Toxoplasma gondii* genotype II causes fatal infections in animal hosts in Europe. Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>> Acesso em: 28 mar., 2013.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKAY, A.J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I.T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J.C.; PFEFFERKON, E.R.; DUBEY, J.P.; AJIOKA, J.W.; ROSS, 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, n. 9, p. 2980-2992, 2005.

LEHMAN, 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. *Journal for Parasitology*, v. 86, n. 5, p. 960-971, 2000.

LINDSTRÖM, I.; SUNDAR, N.; LINDH, J.; KIRONDE, F.; KABASA, J.D.; KWOK, O.C.H.; DUBEY, J.P.; SMITH, J.E. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Uganda chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 39-45, 2008.

MACEDO, M.F.S.B.; MACEDO, C.A.B.; EWALD, M.P.C.; MARTINS, G.F.; ZULPO, D.L.; CUNHA, I.A.L.; TARODA, A.; CARDIM, S.T.; SU, C.; GARCIA, J.L. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 1, p. 74-77, 2012.

MORE´, G.; PARDINI, L.; BASSO, W.; MACHUCA, M.; BACIGALUPE, D.; VILLANUEVA, M.C.; SCHARES, C.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.169, n. 1-2, p. 57–61, 2010.

MURADIAN, V.; FERREIRA, L.R.; LOPES, E.G.; ESMERINI, P.O.; PENA, H.F.; SOARES, R.M.; GENNARI, S.M. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 98, n. 1, p. 128–134, 2012.

NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii* isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina – PR. *Ciências Agrárias*, v. 13, n. 1, p. 32 a 34. 1992.

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, L.N.; COSTA, L.M.J.; MELO, C.F.; SILVA, J.C.R.; BEVILAQUA, C.M.L.; AZEVEDO, S.S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO, D.A.F.V.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast region of Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 95, n. 1, p. 235-237, 2009.

PEIXOTO, C.M.S.; LOPES, C.W.G. Isolamento do *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em galinhas naturalmente infectadas. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 13, p. 105–111, 1990.

PENA, H.F.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Research in Veterinary Science*, v. 81, n. 1, p. 58-67, 2006.

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

PENA, H.F.J.; VITALIANO, S.N.; BELTRAME, M.A.V.; PEREIRA, F.E.L.; 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.

PETERSEN, E.; EDVINSSON, B.; LUNDGREN, B.; BENFIELD, T.; EVENGARD, B. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 25, n. 6, p. 401-404, 2006.

RAGOZO, A.M.A.; PENA, H.F.J.; YAI, L.E.O.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 3-4, p. 307-312, 2010.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RICHOMME, C.; AUBERT, D.; GILOT-FROMONT, E.; AJZENBERG, D.; MERCIER, A.; DUCROT, C.; FERTÉ, H.; DELORME, D.; VILLENA, I. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Veterinary Parasitology*, v. 164, n. 2-4, p. 296-300, 2009.

ROSA, C.; KASAI, N.; SOUZA, S.L.P.; GUERRA, J.L.; REGO, A.A.; GENNARI, S.M. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. *Arquivo do Instituto Biológico (São Paulo)*, v. 68, n. 1, p. 13-17, 2001.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association*, v. 116, n. 9, p. 801-807, 1941.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.

SILVA, D.S.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; SHEN, S.K., KWOK, O.C.; LEHMAN, T.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. *The Journal of Parasitology*, v.89, n. 2, p.394-396, 2003.

SILVA, R.C.; LANGONI, H.; SU, C.; SILVA, A.V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Veterinary Parasitology*, v. 175, n. 1-2, p. 173-177, 2011.

SOARES, R. M. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13. 2004. Ouro Preto. *Resumos....*Jaboticabal, 2004. p.17-19.

SOARES, M.S.; SILVEIRA, L.H.; SILVA, A.V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E.G.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F. de J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 178, n. 1-2, p. 29-34, 2011.

SOULSBY, E. J. L. *Parasitología y enfermedades parasitarias em los animales domésticos*. 7. ed. México: Nueva editorial interamericana, 1987.

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. 7, p. 841-848, 2006.

TOXODB. The Toxoplasma Genome Resource. Disponível em: <<http://toxodb.org/toxo/>> Acesso em: 10 mar. 2012.

VAUDAUX, J.D.; MUCCIOLI, C.; JAMES, E.R.; SILVEIRA, C.; MAGARGAL, S.L.; JUNG, C.; DUBEY, J.P.; JONES, J.L.; DOYMAZ, M.Z.; BRUCKNER, D.A.; BELFORT, R.; HOLLAND, G.N.; GRIGG, M.E. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, v. 202, n. 8, p. 1226–1233, 2010.

WEI, Z.G.; BO, S.; QING, XIE, XIN, L.X.; FENG, Y.R.; KAI, S.X.; ADAM, H.I.; RUI, X. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in China. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 11, n. 8, p. 1347-1353, 2012.

ZHAO, G.W.; SHEN, B.; XIE, Q.; XU, L.X.; YAN, R.F.; SONG, X.K.; HASSAN, I.A.; LI, X.R. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in China. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 11, n. 8, p. 1347-1353, 2012.