LUCIANE HOLSBACK SILVEIRA

Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profº. Drº. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2170
FMVZ

Silveira, Luciane Holsback

Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul / Luciane Holsback Silveira. – São Paulo : L. H. Silveira, 2009.

135 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Isolamento. 3. Galinhas. 4. Genótipos. 5. Pantanal.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de virulência e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de galinhas caipiras do Pantanal Sul Matogrossense, MS, Brasil", protocolado sob o nº1085/2007, utilizando 200 (duzentos) camundongos e 40 (quarenta) galinhas caipira, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research "Evaluation of virulence and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil", protocol number 1085/2007, utilizing 200 (two hundred) mice and 40 (forty) chickens, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVEIRA, Luciane Holsback

Título: Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

A Deus. Por, simplesmente, tudo.

Dedico aos meus Pais,

Minha mãe **Telma**: Perseverança – Coragem - Dignidade .

Desde o início, devo a ti. Você é meu exemplo de vida.

Meu pai **Licínio**: Confiança – Incentivo – Caráter.

Sua presença, simplesmente, basta. Seus cuidados e palavras sempre foram essenciais.

Dizem que os Pais, a gente não escolhe ... ainda assim eu não faria outra escolha!

"A bondade em palavras cria confiança; a bondade em pensamento cria profundidade; a bondade em dádiva cria amor." (Lao Tse).

Dedico a minha irmã **Viviane**. Minha metade. Desde pequena mostrava-me que eu podia. Veja só como isso refletiu em minha vida! Amo ser sua irmã assim como meu amor por você. Obrigada!

Dedico a meu marido, **Carlito**. Sua vivacidade e otimismo me fortalecem. Seu amor me fez crescer... a ti, meu amor e gratidão por toda a compreensão, carinho, apoio e incentivo. Eu te amo.

.... aos animais sacrificados neste experimento. Se existisse um céu para animais, é lá que desejaria que estivessem!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr.º. *Rodrigo Martins Soares* pela oportunidade, paciência, amizade e disposição em ensinar-me. Reconheço todo seu esforço. Eternamente, obrigada.

Ao Prof. Dr.º. *Leonardo José Richtzenhain*. Seu direcionamento gerou esta oportunidade. Obrigada por ter acreditado em mim.

A Prof. Dr.ª. *Solange Maria Gennari* pela oportunidade e disposição em ajudar-me prontamente sempre que precisei. Obrigada pela compreensão e atenção.

Ao Prof. Dr.º. *Paulo Eduardo Brandão* pelos ensinamentos e bom convívio e a Dr.ª. *Sandra Mayumi Nishi*. Obrigada pela honra de tê-los em minhas Bancas de Qualificação e Defesa de Tese e pelas úteis dicas e correções.

Ao Prof. Dr.º. *Aristeu Vieira da Silva* pela simpatia e receptividade sempre que precisei. Obrigada por dar-me a oportunidade de tê-lo em minha Defesa.

A Dr.ª. *Hilda Fátima de Jesus Pena* pelo auxílio no laboratório quando precisei e pelas análises de genotipagem dos isolados obtidos.

Ao meu marido *Carlos Arnaldo Ramos Fertonani* pela colaboração em parte para a realização deste trabalho quanto à escolha e direção do veículo utilizado, do GPS, fotografias e auxílio na coleta dos materiais e ao meu cunhado *Waltemir de Assis Machado* pela eutanásia das galinhas e auxílio na coleta dos materiais.

A *Sheila Oliveira S. Silva* pela paciência em orientar-me no laboratório de Biologia Molecular e Aplicada e Sorologia. Ao *Renato Carasieri* e ao *Pedro C. Ferreira da Silva* pela colaboração nos laboratórios e biotério.

A Vanessa Zappa pela amizade incondicional e o carinho desde o início.

A Alessandra Ragozo, Anaiá Paixão Será, Estela Gallucci, Michelle Klein e Fernanda Lima pelo auxílio em parte deste trabalho.

A Tânia Delonero, Danival Lopes Moreira, Ana Virgínia P. Almeida Prado e Maria Cristina Paick pela educação, disposição e colaboração em tudo que lhes era solicitado. Agradeço toda a atenção, desempenho e desprendimento quando precisei.

A Bibliotecária da FMVZ/USP (Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice), Elza Maria Rosa B Faquim, pela adequação de minha Tese dentro das normas da ABNT. Obrigada pela disponibilidade e agilidade.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses e ao setor de informática. Obrigada a todos!

Expresso também minha gratidão a todos os proprietários e funcionários das propriedades rurais do Pantanal da Mhecolândia, em especial ao Antônio Martins de Matos Neto que disponibilizou-nos estada e alimentação, a Gerusceria Aparecida Melo de Rezende e Vandina Francisca Konostório pela colaboração e imensa disposição em ajudar-nos.

Agradeço a Polícia Militar Ambiental do Estado do Mato Grosso do Sul, Batalhão do município de Rio Negro, pela ajuda e auxílio durante nossa busca as propriedades pelo Pantanal.

A Manuela e Domingos pelo acolhimento mesmo quando “não havia vagas”.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, por proporcionar-me a realização de um sonho.

A cidade de São Paulo por proporcionar-me cultura, lazer e noção de civilidade.

A Faculdade Luiz Meneghel (Campus Luiz Meneghel da Universidade Estadual do Norte do Paraná), em especial ao Sr. Diretor Dr^o Eduardo Meneghel Rando , ao Sr. Coordenador Administrativo Dr^o João Tavares Bueno e a Chefe do Departamento de Patologia Geral Dr^a Laila Kerta Mihhsfeldt pela compreensão nestes 4 anos e por terem apoiado, incentivado e colaborado quando precisei ausentar-me, naquele momento de transição da fase de estadualização da Universidade. Compartilharemos juntos os frutos deste trabalho. Obrigada a todos.

...

Seja humilde, e permanecerás íntegro.

Curva-te, e permanecerás ereto.

Esvazia-te, e permanecerás repleto.

Gasta-te, e permanecerás novo.

O sábio não se exhibe, e por isso brilha.

Ele não se faz notar, e por isso é notado.

Ele não se elogia, e por isso tem mérito.

E, porque não está competindo, ninguém no mundo pode competir com ele.

(Lao Tse – Tao Te Ching)

RESUMO

SILVEIRA, L. H. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul**. [Biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul]. 2009. 135 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

Apesar de o protozoário *Toxoplasma gondii* ser considerado a única espécie válida para o gênero, são reconhecidas três linhagens clonais, denominadas Tipo I, Tipo II e Tipo III, predominantes em países da Europa ocidental e Estados Unidos. Com a pesquisa de amostras deste parasito provenientes de outras regiões do mundo, como no caso do Brasil, várias outras configurações genotípicas diferentes das dos arquétipos mencionados acima vêm sendo encontradas. Neste trabalho, quarenta galinhas/galos (*Gallus domesticus*) de criação livre de oito propriedades rurais de áreas limítrofes ao Pantanal da Nhecolândia no estado do Mato Grosso do Sul foram eutanasiadas e amostras de sangue, cérebro e coração foram coletadas. O sorodiagnóstico foi realizado através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) e, com um “pool” de órgãos dos animais positivos, foi realizado bioensaio em camundongos. Foram obtidos, após o bioensaio, 11 isolados de *T. gondii*. O DNA foi extraído dos tecidos dos camundongos infectados e a tipificação dos isolados foi realizada utilizando 12 marcadores PCR-RFLP, genericamente denominados SAG1, 5’3’SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Vinte e sete galinhas (67,5%) foram sorologicamente positivas para *T. gondii* e 13 (32,5%) foram negativas. Das amostras soropositivas, 7 (25,9%) foram positivas na diluição 1:5, 3 (11,1%) em 1:10, 2 (7,4%) em 1:20, 3 (11,1%) em 1:320, 1 (3,7%) em 1:640, 3 (11,1%) em 1:1280, 2 (7,4%) em 1:2560, 4 (14,8%) em 1:5120 e 2 (7,4%) em 1:10240. Quanto à genotipagem, cinco genótipos foram revelados nos 11 isolados de galinhas de cinco propriedades do município de Aquidauana e uma propriedade do município de Rio Verde do Mato Grosso, incluindo um genótipo misto encontrado em um isolado (TgCkBr198) que demonstrou um complexo cujos padrões são uma combinação de 2 alelos observados em oito *loci*. Dois genótipos foram descritos pela primeira vez, considerando os 140 isolados de galinhas de diferentes regiões brasileiras avaliadas em estudos anteriores. Os resultados corroboram com estudos anteriores sobre os isolados de *T. gondii* no Brasil, confirmando sua diversidade e atipicidade.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Isolamento. Galinhas. Genótipos. Pantanal.

ABSTRACT

SILVEIRA, L. H. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul.** [Biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul]. 2009. 135 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Despite the protozoan *Toxoplasma gondii* is considered the only valid species for the genus, three clonal lineages are recognized, known as the Type I, Type II and Type III, which predominate in Western European countries and the USA. The search for samples of this parasite from other regions of the world, as in the case of Brazil, has revealed different genotypes other than the archetypes above mentioned. In this study, forty free range chickens (*Gallus domesticus*) of eight farms from areas belonging to the Pantanal Nhecolândia in the state of Mato Grosso do Sul were euthanized and samples of blood, brain and heart were collected. The serodiagnosis was performed using the technique of modified agglutination test (MAT) and a “pool” of organs of seropositive animals was used to perform the bioassay in mice. It was obtained 11 isolates of *T. gondii*. DNA was extracted from tissues of infected mice and characterization of isolates was performed using 12 PCR-RFLP markers, known generically SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, C29-2, L358, PK1, Apico and CS3. Twenty-seven chickens (67.5%) were serologically positive for *T. gondii* and 13 (32.5%) were negative. Among the seropositive samples, 7 (25.9%) were positive at 1:5 dilution, 3 (11.1%) in 1:10, 2 (7.4%) in 1:20, 3 (11.1%) at 1:320, 1 (3.7%) at 1:640, 3 (11.1%) in 1:1280, 2 (7.4%) in 1:2560, 4 (14.8%) on 1:5120 and 2 (7.4%) at 1:10240. With regard to genotyping, five genotypes were found within 11 isolates from chickens from five properties in the municipality of Aquidauana and one property of the municipality of Rio Verde of Mato Grosso, including a mixed genotype found in one isolate (TgCkBr198) that showed a complex pattern which is a combination of 2 alleles observed at eight loci. Two genotypes have been described for the first time, considering the 140 isolates from chickens in different Brazilian regions evaluated in previous studies. The results corroborate with previous studies on the isolates of *T. gondii* in Brazil, confirming their diversity and atypicality.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Isolation. Chicken. Genotypes. Pantanal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Divisão geopolítica do Pantanal brasileiro. Bacia do Alto Paraguai e Pantanal no Brasil. Malha municipal do Pantanal, 1998.....	40
Figura 2 -	Delimitação das sub-regiões do Pantanal brasileiro. Bacia do Alto Paraguai e Pantanal no Brasil, 1998	41
Figura 3 -	Mapa representativo da localização das propriedades rurais que participaram do experimento	43
Figura 4 -	Fotos de quatro propriedades rurais que participaram do experimento. <u>A.</u> Presença de gatos com as galinhas; <u>B.</u> Presença de cães; <u>C.</u> Ambiente úmido onde as galinhas permaneciam a maior parte do dia.; <u>D.</u> Presença de veados.	44
Figura 5 -	Cistos de bradizoítos isolados dos cérebros de camundongos bioensaiados..	67
Figura 6 -	Rede filogenética de isolados de <i>T. gondii</i> de galinhas do Brasil. Os táxons representados pelo caractere “#” seguido de dois algarismos correspondem aos genótipos listados no Apêndice C. Sob as identificações das populações encontram-se as siglas dos Estados brasileiros em que integrantes desta população foram encontrados.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Teste de Aglutinação Modificado (MAT) para <i>Toxoplasma gondii</i> . Número de galinhas soropositivas e frequência absoluta em diversas diluições de soros de galinhas do Pantanal, MS, Brasil	57
Gráfico 2 -	Proporção de galinhas positivas e negativas na PCR entre as galinhas soropositivas no MAT nas diversas diluições. Os valores acima das barras indicam as percentagens de galinhas positivas na PCR entre as galinhas positivas no MAT.....	61
Gráfico 3 -	Correlação entre as frequências relativas de galinhas positivas no Teste de Aglutinação Modificado e galinhas positivas pela Reação em Cadeia pela Polimerase, sendo representado pelo quadrado do coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,386$) R^2	63
Gráfico 4 -	Sensibilidade e especificidade do MAT para <i>T. gondii</i> em soro de galinhas, considerando os resultados positivos na PCR como galinhas sabidamente infectadas, em dois pontos de corte distintos (1:5 e 1:40) no MAT	64
Gráfico 5 -	Relação de positividade na PCR comparada à sorologia no MAT nos machos (galos) e fêmeas (galinhas).....	65
Gráfico 6 -	Frequência de camundongos com bradizoítos nos cérebros segundo os títulos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> das galinhas	69
Gráfico 7 -	Correlação entre as frequências de isolamentos nos camundongos inoculados e camundongos positivos no MAT, sendo representado pelo quadrado do coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,87$) R^2	77
Gráfico 8 -	Correlação entre a frequência de camundongos soropositivos para <i>T. gondii</i> e os títulos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> das galinhas pelo MAT, sendo representado pelo quadrado do coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,5442$), R^2 ..	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Localização das propriedades rurais que participaram do experimento e coordenadas geográficas das mesmas.....	39
Tabela 2 -	Distribuição das amostras (numeração e sexo) e localização individual dos animais que participaram do experimento	42
Tabela 3 -	Identificação individual das galinhas soropositivas para <i>Toxoplasma gondii</i> , numeração dos grupos e número de camundongos inoculados por grupo.....	48
Tabela 4 -	Resultado da sorologia para <i>Toxoplasma gondii</i> pelo MAT nas amostras de galinhas, diluição máxima encontrada, sexo e propriedade rural onde se localizava cada animal	58
Tabela 5 -	Número e frequência relativa de animais positivos para <i>Toxoplasma gondii</i> pelo MAT nas diferentes diluições entre as propriedades rurais estudadas.....	60
Tabela 6 -	Quantidade de galinhas positivas na PCR entre as galinhas soronegativas e soropositivas (dentre as titulações encontradas no MAT).....	61
Tabela 7 -	Número e frequência relativa de animais positivos para <i>Toxoplasma gondii</i> pela PCR nas diferentes diluições entre as propriedades rurais estudadas	62
Tabela 8 -	Identificação individual dos camundongos que vieram a óbito, grupo a que pertenciam e período do óbito após a inoculação	66
Tabela 9 -	Distribuição dos grupos de camundongos (infecção crônica) inoculados, número de lâminas contendo cistos com bradizoítos, número de camundongos por grupo cujos cérebros foram encontrados cistos e título da sorologia para <i>Toxoplasma gondii</i> nas galinhas	68
Tabela 10 -	Valores de p* resultantes da comparação das proporções de camundongos com cistos nos cérebros inoculados com tecidos de galinhas de diferentes títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	70

Tabela 11 -	Frequência de isolamentos nos camundongos comparado aos títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> nas galinhas e resultados da PCR nos tecidos das galinhas e dos camundongos.....	72
Tabela 12 -	Distribuição individual dos camundongos simultaneamente positivos na PCR e negativos no MAT e negativos na PCR e positivos no MAT, resultados da PCR e título de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> das galinhas cujos tecidos foram inoculados nos camundongos, presença de cistos nos cérebros dos camundongos inoculados e frequência de isolamentos (pela PCR) dentro de cada grupo.....	75
Tabela 13 -	Frequências de isolamento e de soropositividade para <i>Toxoplasma gondii</i> pelo MAT entre o total de camundongos bioensaiados distribuídos entre os diversos títulos das galinhas.....	76
Tabela 14 -	Valores de p* resultantes da comparação das proporções dos números de camundongos soropositivos no MAT entre os diferentes títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> encontrados nas galinhas pela mesma técnica sorológica	79
Tabela 15 -	Genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de galinhas dos municípios de Aquidauana e Rio Verde do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, através da análise de polimorfismo de DNA pela PCR-RFLP	82
Tabela 16 -	Valores dos Índices de Fixação Fst para análises inter-populacionais, par a par	85
Tabela 17 -	Significância dos testes de desequilíbrio de ligação para os pares de loci polimórficos (nível de significância = 0,05).....	85
Tabela 18 -	Valores das médias das diferenças par a par entre as populações	86
Tabela 19 -	Número de migrantes por geração (M)	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Frequência de galinhas soropositivas para <i>Toxoplasma gondii</i> no Teste de Aglutinação Modificado (MAT), ELISA, Hemaglutinação Indireta (HAI) e Imunofluorescência Indireta (RIFI) e total de animais avaliados em vários estudos epidemiológicos realizados no Brasil	30
Quadro 2 -	Distribuição dos genótipos obtidos dos isolados de <i>Toxoplasma. gondii</i> de galinhas caipiras de diferentes estados brasileiros através da PCR-RFLP utilizando o marcador molecular SAG2.....	34
Quadro 3 -	Distribuição dos genótipos obtidos de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de galinhas caipiras de diferentes estados Brasileiros através da PCR-RFLP utilizando os marcadores moleculares SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico.	37
Quadro 4 -	Distribuição dos marcadores moleculares, oligonucleotídeos (<i>primers</i>) e enzimas de restrição utilizados neste estudo	55
Quadro 5 -	Razão das diferenças do número de galinhas positivas e negativas nos Testes de Aglutinação Modificado (MAT, ponto de corte 1:5) e Reação em Cadeia pela polimerase (PCR).....	62
Quadro 6 -	Razão das diferenças entre o número de camundongos inoculados soropositivos e soronegativos no MAT e positivos e negativos na PCR	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µM	micromolar
BSA	albumina sérica bovina
d	densidade
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	Et alli (e outros) – e colaboradores
g	grama(s)
<i>g</i>	aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
GPS	Global Position Satellite (Sistema de posicionamento por satélite)
H ₃ BO ₃	ácido bórico
HCl	ácido clorídrico
<i>Hha</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma(s)
M	molar
MAT	teste de aglutinação Modificado
<i>Mbo</i>	<i>Moraxella bovis</i>
mg	miligrama(s)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
N	normal

NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
$\text{Na}^+\text{H}_2\text{PO}_4^-$	fosfato de sódio monobásico anidro
Na_2HPO_4	fosfato de sódio dibásico anidro
NaN_3	azida sódica
<i>nestedPCR</i>	<i>nested-PCR</i>
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
P.I.	pós-inoculação
pmol	picomol(s)
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
S	segundo
<i>Sau</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio
SSR	seqüências simples repetidas
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	hidroxometilaminometano
U	unidade internacional
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVOS GERAIS	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	GALINHAS E PROPRIEDADES RURAIS	38
4.2	COLHEITA DE SANGUE E EUTANÁSIA	45
4.3	EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i>	45
4.4	DIGESTÃO PÉPTICA DOS TECIDOS	46
4.5	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS	47
4.5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
4.5.2	PESQUISA DE <i>T. gondii</i>	49
4.6	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS PROVAS MOLECULARES	49
4.6.1	AMOSTRAS SECUNDÁRIAS (AMOSTRAS DOS CAMUNDONGOS)	49
4.6.2	AMOSTRAS PRIMÁRIAS (AMOSTRAS DAS GALINHAS)	50
4.6.3	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA	50
4.7	PROVAS MOLECULARES	51
4.7.1	PCR	51
4.7.2	CICLO UTILIZADO	53
4.7.3	ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO	53
4.8	RFLP E ANÁLISES GENOTÍPICAS	53
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56

5	RESULTADOS	57
5.1	SOROLOGIA DAS GALINHAS – MAT.....	57
5.2	RESULTADO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) NAS AMOSTRAS PRIMÁRIAS DE GALINHAS	60
5.3	BIOSENSAIO EM CAMUNDONGOS E ISOLAMENTO DE <i>T. gondii</i>	65
5.3.1	INFECÇÃO AGUDA NOS CAMUNDONGOS	65
5.3.2	INFECÇÃO CRÔNICA NOS CAMUNDONGOS.....	67
5.4	ANÁLISES GENOTÍPICAS.....	80
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES.....	109
	REFERÊNCIAS	110
	APÊNDICE A	125
	APÊNDICE B.....	127
	APÊNDICE C	133

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii, eucarioto intracelular obrigatório, foi isolado em vários tecidos vivos e células nucleadas além de ter sido encontrado em líquidos orgânicos como sangue, linfa, saliva, leite (coloostro), exsudatos, esperma e líquido peritoneal (NEVES, 1985; DINIZ et al., 1991; AMATO NETO et al., 1995), sendo ainda capaz de se dividir e multiplicar em rubrócitos de mamíferos e em cultura de células de peixes e insetos (KASPER; MINEO, 1994). Potencialmente capaz de infectar muitos mamíferos e aves (SMITH; REDUCK, 2000), o *T. gondii* é conhecido por causar doença congênita e abortos no homem e animais domésticos (DUBEY; BEATTIE, 1988; REMINGTON; DESMONTS, 1990).

A toxoplasmose é reconhecida como uma das infecções parasitárias mais comuns do homem e de vários animais domésticos e selvagens. Estima-se que a exposição pelo agente etiológico da toxoplasmose, *T. gondii*, tenha atingido aproximadamente um terço da população humana mundial (DUBEY, 1998; JACKSON; HUTCHISON, 1989).

As amostras atualmente conhecidas de *T. gondii* possuem similaridades antigênica, morfológica e na capacidade de infectar vários hospedeiros (DUBEY; BEATTIE, 1988; TENTER; JOHNSON, 1997). Estudos iniciados em 1988 com o emprego de técnicas moleculares e com a utilização de isoenzimas demonstraram que a estrutura populacional de *T. gondii* era do tipo clonal. Em 1995, um sistema de tipificação baseado na diferenciação *multilocus* por PCR-RFLP permitiu subdividir a população deste parasito em três linhagens clonais, denominadas tipos I, II e III (HOWE; SIBLEY, 1995). Após a definição das linhagens I, II e III, as tipificações de *T. gondii* passaram a ser realizadas com apenas um *locus*, no caso, o gene SAG2, localizado no cromossomo VIII e que codifica o antígeno de superfície p22 do parasito (HOWE et al., 1997; MONDRAGON et al., 1998; OWEN; TREES, 1999; COLE et al., 2000; FUENTES et al., 2001; GRIGG et al., 2001; DUBEY et al., 2002; ASPINALL et al., 2003; DUBEY et al., 2003c,d; DUBEY et al., 2006c).

Estudos posteriores com marcadores microsátélites (AJZENBERG et al., 2004) e de PCR-RFLP *multilocus* (LEHMANN et al., 2004), aplicados a uma maior número de amostras, revelaram que as amostras de *T. gondii* oriundas de outras regiões do mundo, além de Europa e Estados Unidos, apresentavam genótipos recombinantes em relação aos arquétipos clonais I, II e III (DUBEY et al., 2007a; DUBEY et al., 2004a; SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007b).

Estas variações genéticas foram observadas particularmente no Brasil, onde alguns estudos revelaram que muitos isolados de *T. gondii* eram diferentes dos Tipos I, II e III. Entre muitas outras linhagens divergentes das arquetípicas I, II e III, algumas linhagens consideradas clonais foram encontradas em estudos realizados no Brasil e designadas BrI, BrII, BrIII e BrIV. Com base na taxa de mortalidade em camundongos infectados, o isolado do tipo BrI é considerado virulento, o tipo BrIII não-virulento, e os Tipos BrII e BrIV são considerados virulentos intermediários (PENA et al., 2008).

Em virtude do potencial zoonótico da toxoplasmose, torna-se importante a investigação de genótipos provenientes de infecções em animais, com intuito de verificar a correlação entre a variante encontrada e as propriedades biológicas desta variante, bem como rastrear epidemiologicamente o agente para a identificação de fontes de infecção ou vias de transmissão (OWEN; TREE, 1999).

O estudo da diversidade genética de um parasita pode ser utilizado como instrumento para melhor compreensão da evolução de microorganismos, fornecendo subsídios para avaliação de características biológicas como virulência, resistência a drogas e resistência imunológica (TIBAYRENC 1995; TIBAYRENC 1996) além de esclarecer as distintas manifestações clínicas de uma doença, resultando em melhorias ou obtenção de conhecimento para o controle, diagnóstico e tratamento da mesma (PENA, 2004).

Dentre os trabalhos de pesquisa de *T. gondii* realizados no Brasil, em nenhum deles avaliou-se amostras isoladas de regiões do Pantanal matogrossense. Em virtude da elevada biodiversidade desta região e da ausência de dados relativos à caracterização de infecções toxoplásmicas nesta área, optou-se por conduzir o presente estudo para verificar aspectos etiológicos de infecções por *T. gondii* em galinhas criadas em sistema livre oriundas de regiões fronteiriças ao que se considera região pantaneira.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram estudar a prevalência da toxoplasmose e os métodos de diagnóstico para se identificar a infecção toxoplásmica em galinhas de criação livre (no Brasil, vulgarmente denominadas “galinhas caipiras”) de propriedades da região do Pantanal de Nhecolândia, localizadas no centro-oeste do estado do Mato Grosso do Sul. Ainda, objetivou-se identificar e caracterizar biológica e geneticamente os isolados de *T. gondii* obtidos destes animais, valendo-se para tanto de métodos sorológicos e moleculares de diagnóstico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar a frequência de ocorrência de infecções pelo *T. gondii* em galinhas adultas de propriedades rurais da região do Pantanal da Nhecolândia, centro-oeste do estado do Mato Grosso do Sul;

2) Comparar o desempenho da reação em cadeia pela polimerase com o desempenho do teste de Aglutinação Modificada para o diagnóstico de infecções por *T. gondii* em galinhas naturalmente infectadas e em camundongos experimentalmente infectados;

3) Caracterizar molecularmente as amostras de *T. gondii* isoladas de galinhas caipiras adultas de propriedades rurais da região do Pantanal da Nhecolândia, centro-oeste do estado do Mato Grosso do Sul, empregando o Teste de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição sobre Produtos Amplificados pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR-RFLP) utilizando 12 marcadores PCR-RFLP, genericamente denominados SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3;

4) Avaliar a virulência para camundongos Balb-c dos isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas caipiras adultas de propriedades rurais da região do Pantanal da Nhecolândia, centro-oeste do estado do Mato Grosso do Sul.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Reconhecido e denominado inicialmente por Alfonso Splendore em 1908 como *Leishmania gondii*, o protozoário *T. gondii* foi caracterizado como pertencente ao gênero *Toxoplasma* apenas em 1909 por Nicolle e Manceaux. O parasita foi descoberto simultaneamente por estes autores em baço e fígado de um coelho e de um roedor norte-africano na cidade de São Paulo, Brasil e no Instituto Pasteur da Tunísia (NEVES, 1994).

A origem do nome *Toxoplasma* provém de “*Toxon*”, palavra grega que significa arco e refere-se à morfologia que a forma de multiplicação rápida do parasita (o taquizoíto), se apresenta *in vitro*. O nome da espécie deriva-se de “*Ctenodactylus gundi*”, roedor que vive nas montanhas do sul da Tunísia, no qual o *T. gondii* foi isolado pela primeira vez.

Estudos que datam ainda do século passado relatavam a presença de parasitas semelhantes ao *Toxoplasma* encontrados no sangue ou em *imprints* teciduais, principalmente de fígado e baço em aves silvestres e domésticas, sendo os mesmos considerados, na época, hematozoários (CARINI¹, 1911; ARAGÃO², 1911 apud DUBEY, 2002).

Toxoplasma avium, *T. francae*, *T. fulicae* e *T. columbae* (YAKIMOFF; KOHL-YAKIMOFF, 1912; MARULLAZ, 1913; DE MELLO, 1915, 1935) foram alguns dos nomes dados aos parasitas semelhantes ao *T. gondii* encontrados em pássaros. Finalmente em 1977, Levine denominou definitivamente como *Toxoplasma gondii* todas as espécies de *Toxoplasma* de aves anteriormente descritas.

Quanto à sua taxonomia atual, o *T. gondii* pertence ao REINO Protista, SUBREINO Protozoa, FILO Apicomplexa, CLASSE Sporozoea, SUBCLASSE Coccidia, ORDEM Eucoccidia, SUBORDEM Eimeriina, FAMÍLIA Sarcocystidae, SUBFAMÍLIA *Toxoplasmatinae* (LEVINE, 1977;1980), GÊNERO *Toxoplasma* e ESPÉCIE *T. gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909), sendo este último, o único representante do gênero.

O ciclo biológico do *T. gondii* apresenta uma fase sexuada e outra assexuada. A fase sexuada, chamada gametogonia, se dá intracelularmente no tecido enteroepitelial originando

¹ CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. Bulletin Société Pathology Exotic, v. 4, p. 518-519, 1911.

² ARAGÃO, H. B. Observações sobre algumas hemogregarinas das aves. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 3, p. 54-64, 1911.

oocistos. O ciclo gametogênico ocorre apenas nos hospedeiros definitivos, sendo os felídeos domésticos (gatos) e silvestres (17 conhecidos) os atualmente reconhecidos (DUBEY e ODENING, 2001). O processo de gametogamia ocorre após a esquizogonia ou merogonia, nome da reprodução do tipo assexuada que ocorre nos hospedeiros definitivos e que origina os esquizontes ou merozoítos de primeira e segunda gerações, iniciando a partir daí, o ciclo gametogênico. Bilhões de oocistos imaturos podem ser liberados após a gametogonia e a liberação pode durar semanas. Os felídeos jovens são os mais suscetíveis à doença e também são os principais eliminadores de oocistos no ambiente (FRENKEL; DUBEY, 1972). Após serem eliminados com as fezes no meio ambiente, os oocistos tornam-se esporulados após dois a cinco dias e podem permanecer viáveis por meses e até anos, desde que não expostos à luz solar direta e umidade relativa do ar muito baixa (FRENKEL; DUBEY, 1972; AZEVEDO et al., 1983).

A fase assexuada ou extra-intestinal do ciclo do *T. gondii* que ocorre nos hospedeiros intermediários é chamada endodiogenia e resulta na produção de cistos teciduais (bradizoítos) (DUBEY, 1994). Estes hospedeiros se infectam quer seja a partir de oocistos esporulados, quer seja por carnivorismo, ingerindo neste caso, os cistos com bradizoítos (DUBEY, 1993; DUBEY et al., 1996, 1998). A fase de parasitemia dura de oito a dez dias. Os esporozoítos ou bradizoítos livres se transformam em taquizoítos e passam para a circulação geral, invadindo mucosa intestinal e macrófagos. Segue-se uma fase mesenquimatosa e posterior fase parenquimatosa que correspondem respectivamente nas fases de multiplicação por endodiogenia e multiplicação lenta dos bradizoítos no interior dos cistos (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

O ciclo de *T. gondii* atualmente encontra-se elucidado, entretanto foi Hutchison, em 1965, o primeiro a reconhecer o papel do gato no ciclo de vida do parasita, mostrando que estes animais poderiam eliminá-lo pelas fezes. Porém, *T. gondii* permaneceu no grupo de parasitas de filogenia desconhecida durante muitos anos. Weinman e Chandler (1954), conhecendo as fases parasitárias do protozoário (taquizoítos e bradizoítos), sugeriram que o carnivorismo poderia ser um possível mecanismo de infecção.

Esta possibilidade já havia sido reconhecida em 1937 quando foi observado que “um método natural” de infecção poderia ser por meio da ingestão de tecidos contaminados com *Toxoplasma* (SABIN; OLITSKY, 1937). Em 1960, foi demonstrado que cistos de bradizoítos no tecido poderiam sobreviver à exposição ao ácido e tripsina, o que confirmaria o possível papel da ingestão de cistos teciduais na transmissão do parasita (JACOBS et al., 1960). O

papel desempenhado por ingestão de carne mal cozida na transmissão de *Toxoplasma* aos seres humanos foi confirmado por Desmonts et al. (1965) quando observou aumento da incidência de toxoplasmose em pacientes em tratamento para tuberculose que começaram a consumir carne bovina e eqüina para fins terapêuticos. Quando estas carnes foram substituídas por carne ovina, a prevalência de pacientes soropositivos para toxoplasmose subiu para 100% ao ano.

Resultados de alguns estudos afirmam que as infecções toxoplásmicas ocorrem principalmente em locais sombreados e de alta umidade (FRENKEL; RUIZ, 1977; AZEVEDO et al., 1983). Entretanto, surtos de toxoplasmose foram relatados por inalação de oocistos por aerossol. Um foco de toxoplasmose em 1977 no estado de Atlanta, EUA foi atribuído à inalação nasofaringeana de poeira contaminada com oocistos de fezes de gatos selvagens durante um evento eqüestre (TEUTSCH et al., 1979).

As primeiras implicações humanas de toxoplasmose datam do início da década de vinte quando o *T. gondii* foi relacionado, porém não diagnosticado, à ocorrência de cistos oculares em uma criança com hidrocefalia (JANKU, 1923). Após cinco anos, Torres³ (1927 apud AMATO NETO et al., 1995, 154p.) descreveu a presença do parasita em histopatologia de musculatura cardíaca, coração e cérebro de um recém nascido que faleceu com sintomatologia compatível a toxoplasmose.

Vergara et al. (1985) afirmam que no Brasil 70% da população humana foi infectada em algum momento da vida. Entre os diversos levantamentos sorológicos já realizados identificaram-se prevalências variadas nas regiões Brasileiras, como 73,9, 74,7, 51,6, 78,7, 50,3 e 69% nas regiões da Amazônia, cidade de Recife, alto Xingu no estado do Mato Grosso, estado do Rio de Janeiro, Minas Gerais e na Grande São Paulo, respectivamente (ARAÚJO, 1970; BARUZZI, 1970; COUTINHO et al., 1981; JAMRA; GUIMARÃES, 1981; FERRARONI; LACAZ, 1982; AZEVEDO et al., 1983; GUIMARÃES et al., 1993).

Entretanto, dados sobre a prevalência da toxoplasmose em humanos apenas foram conhecidos a partir de 1948, com a introdução do teste de SABIN e FELDMAN o qual

³ TORRES, C. M. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caractérisé par la présence d'un parasite intracellulaire, très proche de *Toxoplasma* et de l'Endecephalitozoon, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire sous-cutane et le tissunerveux. Comptes rendus des séances et mémoires de la Société de biologie, v. 97, p. 1778-1781, 1927.

contribui para o início de levantamentos epidemiológicos e diagnósticos sorológicos da doença.

A partir daí outras formas de diagnóstico foram sendo descritas como a prova de sensibilidade cutânea à *Toxoplasma* por Frenkel⁴ (1948 apud AMATO NETO et al., 1995, p. 154), reação de Hemaglutinação (JACOBS; LUNDE, 1957; CAMARGO et al., 1986; CAMARGO et al., 1989; CAMARGO, 1996), ELISA (CAMARGO et al., 1978), Imunofluorescência (AMATO NETO et al., 1995; CAMARGO, 1996) e a Reação em Cadeia pela Polimerase (AQUIZERATE et al., 1993; HOLLIMAN, 1994).

A infecção, bem como a doença, tem sido detectada com maior sensibilidade através dos métodos moleculares de diagnóstico como Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Contudo, como limitação da técnica, a positividade não discrimina se o DNA amplificado provém de parasitas viáveis ou de fragmentos do parasita (HOLLIMAN, 1994). Devido a isso, o bioensaio em animais susceptíveis reproduz a infecção quando há parasitas viáveis nos tecidos animais, refletindo a presença ativa dos mesmos.

Dentre os animais sensíveis à inoculação, citam-se hamsters, cobaias, camundongos e coelhos. Destes, os camundongos são os melhores por serem os mais susceptíveis à infecção experimental, podendo, dependendo da virulência da cepa inoculada, fornecer milhões de taquizoítos em apenas três dias depois da infecção experimental (PFEFFERKORN, 1990; DUBEY, 1993; AMATO NETO et al., 1995).

As prevalências de infecção pelo *T. gondii* em seres humanos e animais são elevadas no Brasil. Em estudos sobre a prevalência da infecção pelo *T. gondii* em gatos dos estados de São Paulo e Paraná foram encontrados 35% (de 237 animais avaliados) de animais soropositivos em São Paulo (PENA et al., 2006) e 84% (de 58 animais avaliados) no Paraná (DUBEY et al., 2004a). A elevada taxa de gatos soropositivos poderia refletir uma maciça contaminação do ambiente por oocistos de *T. gondii* e conseqüentemente, uma contaminação do alimento e da água utilizados para o consumo humano (DUBEY et al., 2004). Além disso, o ambiente altamente contaminado poderá levar a uma alta taxa de infecção por *T. gondii* em

⁴ FRENKEL, J. K. Dermal hypersensitivity to *Toxoplasma* antigens (toxoplasmins). Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 68, p. 634-6399, 1948. Obs: seguir este modelo para os outros apud.

hospedeiros intermediários, aumentando a oportunidade de recombinação genética em gatos (PENA et al., 2008).

Outras pesquisas sobre a soroprevalência da toxoplasmose em animais realizados em frangos e cães dos estados do Rio Grande do Sul, Pará e São Paulo revelaram 46% (84 animais avaliados) de positividade nos frangos (DUBEY et al., 2007a) do Rio Grande de Sul e Pará e 36% (de 118 animais avaliados) em cães de São Paulo (DUBEY et al., 2007b).

Entre as aves domésticas que podem ser acometidas pela toxoplasmose têm-se a galinha, o peru, o pato e o canário, o que confirma o caráter eurixeno do *T. gondii*, capaz de infectar animais pertencentes a grupos distintos. A resistência a infecção parece estar relacionada à idade dos animais, sendo os mais jovens mais susceptíveis (AMATO NETO, et al., 1995).

O papel das criações de galinhas em escala industrial na transmissão toxoplásmica para humanos é de pequena importância, devido ao sistema de criação ser rápido e não permitir o contato com felinos, porém, contrasta com a criação doméstica em pequena escala, onde as aves permanecem durante anos convivendo no mesmo ecossistema (ARAUJO et al., 1989; LITERAK; HEJLICEK, 1993).

Neste caso, galinhas criadas ao ar livre (caipiras) estão suscetíveis a infecção pelo *T. gondii*, pois podem se infectar através de alimento ou água contaminada com oocistos. Porém, estes animais são considerados resistentes a doença clínica (AMATO NETO et al., 1995). Galinhas oriundas de pequenas criações podem conter cistos teciduais de *T. gondii*, representando risco de infecção para o homem, principalmente quando manipulam carnes cruas em condições precárias de higiene ou através do consumo de carnes cruas ou semi-cozidas (LITERAK; HEJLICEK, 1993).

Em infecções experimentais com *T. gondii* em frangos de corte, foram isolados cistos do parasita em vários órgãos, principalmente no cérebro, pâncreas, baço, retina, rins, coração entre outros. Estes animais não apresentaram nenhum sinal clínico de toxoplasmose. Neste trabalho o autor alerta sobre a real possibilidade de transmissão deste agente para o homem, pela presença de cistos no coração e musculatura esquelética (KANETO et al., 1997).

Da mesma forma, Medeiros e Lopes (1996) isolaram o *T. gondii* em coração e cérebro de galinhas e Dubey et al. (1993), estudando o *T. gondii* através de inoculações experimentais em galinhas, confirmaram que esses animais podem desenvolver anticorpos

para a toxoplasmose, bem como formarem cistos teciduais em cérebro, coração e musculatura esquelética.

Araujo et al. (1989), estudando a toxoplasmose em frangos de corte encaminhados para abatedouros na grande Porto Alegre, descreveram a necessidade de se determinar a importância das galinhas criadas em fundo de quintal para a epidemiologia da toxoplasmose.

Estudos sobre a soroprevalência do *T. gondii* neste tipo de criação de galinhas no norte do Paraná revelaram positividade de 10,3% na reação de Imunofluorescência. Neste estudo a soroprevalência não foi influenciada pelo sexo dos animais, pela finalidade da criação (corte ou postura) nem pela presença de felinos sororeagentes nas propriedades (GARCIA et al., 2000). Anos mais tarde, outro estudo sorológico em galinhas caipiras do mesmo estado relatou soropositividade para *T. gondii* de 37,5% pela mesma técnica sorológica de diagnóstico (GARCIA et al., 2004). Ainda pelo Teste de Imunofluorescência, Bonna et al. (2006) avaliaram 316 frangos de propriedades rurais do município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro e verificaram soroprevalência de 47,8% para toxoplasmose. Estes autores afirmaram que estudos sobre a prevalência da infecção por *T. gondii* em galinhas caipiras podem servir como parâmetro para se traçar metas de ações profiláticas em regiões rurais, principalmente quando associadas à clínica e às características ambientais e populacionais, pois podem detectar os diversos fatores de risco à comunidade.

Muitos outros estudos foram publicados sobre soroprevalência da toxoplasmose em galinhas caipiras utilizando vários métodos de imunodiagnóstico. Araujo et al. (1989) verificaram prevalência de 2,8% na prova de Hemaglutinação Indireta em frangos de matadouro do Rio Grande do Sul. Em pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* pelo teste de Aglutinação Modificado (MAT) em 300 soros de frango de corte abatidos para consumo em Belém do Pará, Barbosa (2007) detectou anticorpos em uma (0,33%) amostra proveniente do abate clandestino. Neste estudo foram avaliados frangos provenientes de abates industrial e clandestino. Este pesquisador também ressaltou a importância da adoção de investigação sorológica em frangos criados em fundo de quintal ou em escala industrial como medida preventiva contra o risco de contaminação, apesar de não ter encontrado nenhum animal soropositivo entre os animais criados em escala industrial. Já Meireles (2001) não detectaram anticorpos anti-*T. gondii* em soros de 185 frangos de corte avaliados pelo Teste de ELISA. Estas e outras pesquisas soroepidemiológicas realizadas no Brasil estão demonstradas no quadro 1.

ESTADO	Nº ANIMAIS AVALIADOS	SOROPREVALÊNCIA PARA <i>T. gondii</i> (%)	TÉCNICA UTILIZADA (Ponto de corte)	REFERÊNCIA
Rio Grande do Sul *	500	2,8%	HAI (1:64)	ARAÚJO et al. (1989)
Paraná	155	10,3%	RIFI (1:16)	GARCIA et al. (2000)
São Paulo *	185	0%	ELISA (1:100)	MEIRELES (2001)
São Paulo	82	39,0%	MAT (1:5)	DUBEY et al. (2002)
Paraná	40	40,0%	MAT (1:5)	DUBEY et al. (2003c)
Rio de Janeiro	198	65,2%	MAT (1:25)	SILVA et al. (2003)
Rondônia	50	66,0%	MAT (1:5)	DUBEY et al. (2006c)
Rio de Janeiro	316	47,8%	RIFI (1:16)	BONNA et al. (2006)
Pará *	300	0,33%	MAT (1:5)	BARBOSA (2007)
Pará	34	58,8%	MAT (1:10)	DUBEY et al. (2007a)
Rio Grande do Sul	50	38,0%	MAT (1:10)	DUBEY et al. (2007a)
Rio Grande do Norte	47	36,2%	MAT (1:5)	OLIVEIRA et al. (2009)
Pernambuco	20	45,0%	MAT (1:5)	OLIVEIRA et al. (2009)
Maranhão	20	70,0%	MAT (1:5)	OLIVEIRA et al. (2009)
Bahia	20	50,0%	MAT (1:5)	OLIVEIRA et al. (2009)
Ceará	25	68,0%	MAT (1:5)	OLIVEIRA et al. (2009)
Sergipe	12	41,7%	MAT (1:5)	OLIVEIRA et al. (2009)
Alagoas	8	100%	MAT (1:5)	OLIVEIRA et al. (2009)
Mato Grosso do Sul	40	67,5%	MAT (1:5)	Este estudo

* frangos de corte destinados a abatedouro.

Quadro 1 Frequência de galinhas soropositivas para *Toxoplasma gondii* no Teste de Aglutinação Modificado (MAT), ELISA, Hemaglutinação Indireta (HAI) e Imunofluorescência Indireta (RIFI) e total de animais avaliados em vários estudos epidemiológicos realizados no Brasil.

Entretanto, Literak e Hejlícek (1993), na República Tcheca, encontraram 5,1% e 0,01% de prevalências em galinhas de pequenas criações e criadas em escala industrial, respectivamente, através da prova de Sabin-Feldman. Cumpre assinalar que esta técnica tem sido associada à baixa sensibilidade diagnóstica para detecção de anti-corpos anti-*T. gondii* em galinhas (RUIZ; FRENKEL, 1980; LITERAK; HEJLÍCEK, 1993).

Dubey et al. (1993) compararam vários métodos de imunodiagnósticos para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e verificaram sensibilidade para detecção destes anticorpos em soro de galinhas apenas nos testes de Aglutinação Modificado e ELISA, sendo também avaliados os testes de Aglutinação em Látex, Sabin-Feldman e Aglutinação Indireta.

No trabalho de Garcia et al. (2004) a reação de Imunofluorescência Indireta demonstrou ser eficiente para detectar anticorpos anti-*T. gondii* nas aves, porém os mesmos autores afirmaram que mais estudos teriam que ser realizados para avaliar a sensibilidade desta técnica nessa espécie animal.

Não só no Brasil, mas em várias partes do mundo, estudos sorológicos estão sendo utilizados para detecção da prevalência de infecção pelo *T. gondii* em galinhas domésticas. O interesse está relacionado ao fato que estes animais têm o hábito de “ciscar” e o resultado seria sua infecção pela ingestão de oocistos esporulados. Galinhas caipiras usualmente comem resto de comida fornecida pelos criadores e também tem hábito de pregar eventualmente pequenos roedores, ocasiões em que podem se infectar por cistos teciduais. Em conjunto, estas características comportamentais tornam estes animais bons indicadores epidemiológicos do agente no meio ambiente (DEVADA et al., 1998).

Ghorbani et al. (1990), Devada et al. (1998) e Dubey et al. (2005a) encontraram 33, 39,5 e 36,3% de soropositividade em galinhas de vida livre no Irã, na Índia e na Áustria respectivamente. Publicação recente revelou uma prevalência de 36,1% em galinhas de criação livre, através da técnica de Imunofluorescência Indireta para *T. gondii*, realizada na região de Shiraz no Iran (ASGARI, et al., 2006). Outros estudos relatam soroprevalências para *T. gondii* pelo Teste de MAT em galinhas caipiras provenientes dos países de Ghana (64%), Indonésia (24,5%), Itália (12,5%), Polônia (30%) e Vietnam (24,2%) (DUBEY et al., 2008a).

As amostras atualmente conhecidas de *T. gondii* são similares antigenicamente, morfologicamente e semelhantes também na capacidade de infectar vários hospedeiros (DUBEY; BEATTIE, 1988; TENTER; JOHNSON, 1997).

Antes do desenvolvimento de métodos sorológicos para detecção de variabilidade genética entre os microorganismos, a variação morfológica era a melhor maneira de se avaliar esta variabilidade. Chakraborty et al. (1991) afirmaram que embora a variação morfológica fosse a maneira mais conveniente de se identificar diferenças entre indivíduos, não há como se afirmar com certeza o que é realmente variabilidade genética. Fatores ambientais também influenciam na variação morfológica e este tipo de variação é difícil de quantificar, entretanto com o advento de métodos bioquímicos e moleculares, estas dificuldades foram superadas, pois a variação genética poderia ser detectada em nível molecular (TAGLIANETTI, 2007).

Apesar de o gênero *Toxoplasma* ser considerado monoespecífico, a espécie *T. gondii* foi considerada por algum tempo como sendo composta por três linhagens clonais, chamadas de tipos I, II e III. Esta estrutura populacional foi definida com auxílio de um sistema de tipificação baseado no Teste de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição sobre Produtos Amplificados pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR-RFLP) (HOWE; SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997) e com amostras oriundas predominantemente da Europa Ocidental e Estados Unidos. Os tipo clonais I e II estão geralmente associados à toxoplasmose clínica em humanos (HOWE et al., 1997), entretanto, essa caracterização genética é realizada a partir de isolados de pacientes que morreram com toxoplasmose. Ao contrário dos humanos, a maioria dos isolados do *T. gondii* de animais são do tipo II ou III, independente do estado clínico do animal (HOWE; SIBLEY, 1995).

O polimorfismo dos fragmentos de DNA é encontrado como resultado da clivagem do DNA pelas enzimas de restrição que reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases. Portanto, ao se clivarem duas moléculas de DNA relacionadas, porém diferentes, com a mesma enzima de restrição, pode-se obter segmentos de comprimentos diferentes. Quando são separadas por eletroforese em um gel são observadas bandas de diferentes pesos moleculares (CLARK; RUSSEL, 1997).

Após a descoberta das linhagens, a evolução clonal de *T. gondii* foi considerada indiscutível e, a partir de então, sua caracterização molecular passou a ser feita com o emprego de um único *locus* gênico, no caso, o gene *SAG2*, localizado no cromossomo VIII e que codifica o antígeno de superfície p22 do parasito (HOWE et al., 1997).

A caracterização molecular de *T. gondii* isolados de humanos e animais através da técnica de PCR-RFLP e com avaliação do polimorfismo no *locus* *SAG2* vem ocorrendo desde 1995 (HOWE; SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997; MONDRAGON et al., 1998; OWEN;

TREES, 1999; COLE et al., 2000; FUENTES et al., 2001; GRIGG et al., 2001; ASPINALL et al., 2003), além de Aspinall et al. (2002) que genotiparam isolados de *T. gondii* de produtos alimentícios à base de carne suína. Todos estes pesquisadores determinaram os genótipos também em outros *loci*, além do SAG2, como no *locus* SAG1 (que também, assim como o gene SAG2, é codificador de antígeno de superfície) e outros como 850, L328, 62 (de função desconhecida), ROP1 (codificador de proteína de roptria), além dos *loci* TGR1E e TGR6.

No Brasil, a avaliação dos genótipos de *T. gondii* em animais foi realizado pela primeira vez por Dubey et al. (2002) em amostras de galinhas caipiras infectadas naturalmente e procedentes do interior do estado de São Paulo. A partir daí, vários outros estudos relacionados à genotipagem dos isolados do protozoário em galinhas foram realizados e publicados. No quadro 2 estão distribuídos os genótipos de *T. gondii* encontrados em galinhas de diferentes estados brasileiros, caracterizados até o ano de 2006 quando ainda era utilizado apenas o marcador molecular SAG2.

Após a pesquisa dos genótipos de isolados de *T. gondii* de galinhas no estado de São Paulo no Brasil, foram realizadas outras pesquisas utilizando apenas este marcador (SAG2) por diversos pesquisadores em todo o mundo, como no Egito (DUBEY et al., 2003a), Índia (SREEKUMAR et al., 2003), Estados Unidos (DUBEY et al., 2003b), Áustria (DUBEY et al., 2005a), Israel (DUBEY et al., 2004b), Colômbia (DUBEY et al., 2005b), Argentina (DUBEY et al., 2005c), Portugal (DUBEY et al., 2006b) e em outros estados Brasileiros como no Paraná (DUBEY et al., 2003c), Rio de Janeiro (DUBEY et al., 2003d) e Rondônia (DUBEY et al., 2006c), conforme demonstrados no quadro 2.

Em situações onde é necessário a rastreabilidade do agente ou uma associação entre os aspectos clínicos de uma infecção e a cepa do agente, são desejáveis a utilização de métodos capazes de caracterizar genótipos com uma maior resolução (AJZENBERG et al., 2002). Trabalhos de caracterização molecular de *T. gondii*, como os que utilizam marcadores com maior grau de polimorfismo, os marcadores microsatélites, vêm apresentando melhores resultados, pois detectam variação existente entre uma mesma espécie (GOLDSTEIN et al., 1995).

ESTADO	REFERÊNCIA	ISOLADOS OBTIDOS	GENÓTIPOS (TIPOS)			
			I	II	III	I + III
São Paulo	Dubey et al., (2002)	25	16	0	9	0
Rio de Janeiro	Dubey et al., (2003d)	48	34	0	13	1
Rondônia	Dubey et al., (2006c)	24	14	0	10	0
Paraná	Dubey et al., (2003c)	13	7	0	6	0

Quadro 2 - Distribuição dos genótipos obtidos dos isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras de diferentes estados brasileiros através da PCR-RFLP utilizando o marcador molecular SAG2.

Os microsatélites, também denominados de repetições de seqüências simples, compreendem uma classe de DNA repetitivo composto de dois a seis pares de base e encontram-se dispersos no genoma da grande maioria dos organismos estudados (FREIMER; SLATKIN, 1996). Com a descoberta do polimorfismo em microsatélites (VNTR – *variable number of tandem repeat*), medidas de distância genética foram sugeridas por alguns autores para a análise de variação genética com base no número de repetições (FONDON; GARNER, 2004). A alta taxa de mutação dos *loci* de microsatélites, comparado com outras regiões do DNA (como os *loci* que sofrem variabilidade por substituição nucleotídica) gera uma grande variação genética.

Estes marcadores microsatélites para *T. gondii*, desenvolvidos por Ajzenberg et al. (2004) e de PCR-RFLP *multilocus* de Lehmann et al. (2004) aplicados a uma amostragem maior e com maior diversidade regional, começaram a demonstrar que a subdivisão da população de *T. gondii* em apenas três arquétipos (I, II e III) não tinha sustentação científica. Com efeito, a genotipagem usando marcadores *multilocus* em isolados de *T. gondii* obtidos a partir de frangos (DUBEY et al., 2007a), gatos (DUBEY et al., 2004a; SU et al., 2006) e cães (DUBEY et al., 2007b) revelaram que a estrutura populacional do parasito no Brasil é bastante diversificada e realmente diferente daquela encontradas na Europa e América do Norte. Nestes estudos, foram empregados marcadores *multilocus* PCR-RFLP, sendo revelado

que as amostras de *T. gondii* oriundas de outras regiões do mundo, além de Europa e EUA, apresentavam genótipos recombinantes em relação os arquétipos clonais I, II e III .

A genotipagem do *T. gondii* utilizando marcadores moleculares na PCR-RFLP tem gerado informação valiosa para revelar a diversidade do parasita. As vantagens destes marcadores PCR-RFLP são a facilidade de utilização e a alta resolução na identificação de isolados de *T. gondii*. Estes marcadores foram originalmente desenvolvidos com base na sequência de polimorfismo de DNA das linhagens clonais I, II e III (SU et al., 2006).

Com o emprego de PCR-RFLP, alelos distintos dos alelos não-clonais (denominados u-1, u-2) são revelados por alguns marcadores, incluindo SAG1, SAG2 (novo), C22-8, c29-2 e PK1. Também são detectadas combinações de alelos dos diferentes arquétipos. Em conjunto, estes achados sugerem que muitos isolados de *T. gondii* são diferentes dos Tipos I, II e III na sequência de DNA. De acordo com a pesquisa de Pena et al. (2008) esta afirmação é verdadeira particularmente quando se avalia isolados de *T. gondii* a partir de população de parasitas (diferentes isolados) encontrada no Brasil.

A partir de 2006 vários trabalhos sobre genotipagem do *T. gondii* em isolados de galinhas foram publicados no mundo e também no Brasil. A partir de 2006, pesquisadores utilizaram os marcadores SAG1, SAG2, SAG3, BTUB e GRA6 para genotipagem de isolados de *T. gondii* na Nicarágua e na Costa Rica (DUBEY et al., 2006d,e).

A partir de 2007, um maior número de marcadores foi incluído neste tipo de estudo, sendo C22-8, C29-2, L358, PK1 e Apico utilizados nos trabalhos de Dubey et al. (2007a) e Velmurugan et al. (2008) além dos anteriormente citados, respectivamente no Rio Grande do Sul (Brasil) e na África. Todos estes 10 marcadores também foram utilizados por Dubey et al. (2008a) na genotipagem de isolados de *T. gondii* de galinhas de Ghana, Indonésia, Itália, Polônia e Vietnã.

Em São Paulo, recentemente foram avaliados 46 isolados de *T. gondii* provenientes de gatos, utilizando vários marcadores PCR-RFLP, incluindo o novo marcador, CS3, localizado no cromossomo VIIa e relacionado à virulência aguda. Linhagens clonais típicas do Brasil foram encontradas e designadas BrI, BrII, BrIII e BrIV. Com base na taxa de mortalidade em camundongos infectados, o isolado do tipo BRI foi considerado virulento, o Tipo BrIII não-virulento, e os Tipos BrII e BrIV foram considerados virulentos intermediários (PENA et al., 2008).

Em outro recente trabalho publicado, 151 isolados de *T. gondii* de galinhas de criação livre do Brasil foram genotipados, sendo incluído nesta pesquisa, 117 novos isolados de 11 estados Brasileiros (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo, Sergipe e Rondônia). A genotipagem foi realizada baseando-se em 10 marcadores PCR-RFLP (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico) (DUBEY et al., 2008b).

Dos 151 isolados avaliados, foram identificados 58 genótipos, sendo 29 isolados simples e 29 genótipos identificados em dois ou mais isolados. Apenas um dos 151 isolados avaliados pertencia ao tipo clonal I e cinco ao tipo clonal III em todos os *loci*. Dois isolados apresentaram padrão de infecção mista e outro isolado apresentou padrão do tipo clonal II em todos os *loci*, exceto um no marcador molecular BTUB. O intuito dos autores na utilização destes marcadores foi alcançar uma alta resolução na identificação e avaliação de todo o conjunto de dados sobre genótipos de *T. gondii* isolados de frangos do Brasil. Os resultados indicaram, conforme já relatado por Pena et al. (2008), uma elevada diversidade genética entre isolados de *T. gondii*, independentemente da localização geográfica (DUBEY et al., 2008b).

Portanto, quando se comparam os genótipos de diferentes hospedeiros e a localização geográfica, não se observa relação entre os genótipos. Sugere-se então, que *T. gondii* tem uma população endêmica no Brasil, nos quais mudanças genéticas frequentes têm gerado uma variedade de recombinantes. Conforme relatado anteriormente, isto contraria os achados na América do Norte e Europa os quais somente três linhagens clonais predominam e mudanças genéticas, sugerindo recombinação genética entre estas linhagens, são raras (DARDÉ et al., 1992; HOWE; SIBLE, 1995; AJZENBERG et al., 2002).

No quadro 3, encontra-se a distribuição dos genótipos de *T. gondii*, realizados a partir de 2007, onde foram utilizados estes novos marcadores moleculares, além de uma reavaliação genotípica com isolados anteriormente genotipados (DUBEY et al., 2008b).

Estado	Referências	Isolados obtidos	Tipo e quantidade de genótipos encontrados (número de isolados)							
			BrI	BrII	BrIII	BrIV	I	II	III	Atípicos
Pará	Dubey et al. (2007a;2008b)	TgCkBr 107 a 116; TgCkBr 141 a 145.	X ⁽¹⁾	0	0	0	0	0	0	10 ⁽¹⁴⁾
Rio Grande do Sul	Dubey et al. (2007a;2008b)	TgCkBr 146 a 164.	0	0	0	X ⁽⁷⁾	X ⁽¹⁾	0	X ⁽³⁾	4 ⁽¹⁵⁾
Rondônia	Dubey et al. (2006c;2008b)	TgCkBr 107;119 a 120;122 a 124; 126;127;129 a 140.	X ⁽²⁾	0	X ⁽⁴⁾	0	0	0	0	4 ⁽¹⁴⁾
Paraná	Dubey et al. (2003c;2008b)	TgCkBr 93 a 102;104.	X ⁽⁴⁾	X ⁽¹⁾	0	0	0	0	0	4 ⁽⁶⁾
Rio de Janeiro	Dubey et al. (2003d;2008b)	TgCkBr 26 a 28;30 a 34;36 a 38; 40 a 42, 44 a 52; 54 a 62, 64 a 67, 69, 74 a 76; 78 a 82; 84 a 90;92	X ⁽⁴⁾	X ⁽²⁾	0	X ⁽¹⁾	0	0	X ⁽²⁾	14 ⁽⁴⁴⁾
São Paulo	Dubey et al. (2002;2008b)	TgCkBr 7 a 8; 10;11; 13;16; 17;19;23;24	X ⁽¹⁾	0	X ⁽³⁾	0	0	0	0	4 ⁽⁶⁾
Pernambuco	de Oliveira et al. (2009); Dubey et al. (2008b)	TgCkBr 165 e 166	0	0	0	0	0	0	0	2 ⁽²⁾
Rio Grande do Norte	de Oliveira et al. (2009); Dubey et al. (2008b)	TgCkBr 167 a 170	0	0	0	0	0	X ^{(1)*}	0	3 ⁽⁴⁾
Maranhão	de Oliveira et al. (2009); Dubey et al. (2008b)	TgCkBr 171 e 172	0	0	0	0	0	0	0	1 ⁽²⁾
Bahia	de Oliveira et al. (2009); Dubey et al. (2008b)	TgCkBr 173 a 176	0	0	0	0	0	0	0	3 ^{(4)**}
Ceará	de Oliveira et al. (2009); Dubey et al. (2008b)	TgCkBr 177 a 182	0	0	0	0	0	0	0	5 ⁽⁶⁾
Sergipe	de Oliveira et al. (2009); Dubey et al. (2008b)	TgCkBr 183	0	0	0	0	0	0	0	1 ⁽¹⁾
Alagoas	de Oliveira et al. (2009); Dubey et al. (2008b)	TgCkBr 184 a 187	0	0	0	0	0	0	0	3 ^{(4)***}

* TgCkBr 168 – Alelos do padrão TIPO II em todos os marcadores, exceto em BTUB. “X” assinala o tipo de genótipo caracterizado. Genótipos atípicos são numerados conforme quantidade encontrada e sobrescrito, encontram-se a quantidade de isolados dos quais os genótipos foram caracterizados.

** Incluindo Isolado TgCkBr 175 – Infecção Mista; *** Incluindo Isolado TgCkBr 187 – Infecção Mista.

Quadro 3 - Distribuição dos genótipos obtidos de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras de diferentes estados Brasileiros através da PCR-RFLP utilizando os marcadores moleculares SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os animais participantes deste experimento foram obtidos de propriedades rurais do Pantanal sul matogrossense, região centro-oeste do Brasil e os procedimentos experimentais que compreenderam análises sorológicas, inoculações em camundongos, análises parasitológicas e técnicas moleculares, foram realizados nos Laboratórios de Doenças Parasitárias e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo (VPS-FMVZ-USP).

4.1 GALINHAS E PROPRIEDADES RURAIS

Participaram do experimento 40 galinhas de criação livre (caipiras), selecionadas aleatoriamente de oito propriedades situadas nos municípios de Aquidauana e Rio Verde do Mato Grosso na sub-região pantaneira da Nhecolândia, estado do Mato Grosso do Sul, centro-oeste Brasileiro (Tabela 1 e Figura 1). Foram selecionados cinco animais de cada propriedade. O número estimado de galinhas por propriedade era de aproximadamente 50 animais. As coletas foram realizadas entre os dias três e seis de janeiro de 2007.

O Pantanal matogrossense é susceptível a inundações periódicas e está situado no sentido leste-oeste, entre os meridianos 55° oeste e a fronteira do Brasil com Bolívia e Paraguai e no sentido norte sul, entre os paralelos 16 e 22° sul. É reconhecido como a maior planície inundável do mundo, de clima marcadamente sazonal, com período de chuvas de outubro a abril e um período de seca de maio a setembro, sendo o período e intensidade das cheias variável de ano para ano (AMARAL FILHO, 1986).

A altitude da região varia de 83 a 170 metros acima do nível do mar, apresentando uma topografia plana e de pouca declividade, circundada por planaltos com altitude superior a 400 metros. A vegetação é formada por matas subperenifólias, vegetação de cerrado, savanas arbustivas, matas e campos (SILVESTRE FILHO; ROMEU, 1974). Nestas condições a

atividade econômica mais expressiva é a pecuária de corte em regime extensivo, com predominância da raça Nelore, de origem indiana.

Tabela 1 - Localização das propriedades rurais que participaram do experimento e coordenadas geográficas das mesmas.

PROPRIEDADE	MUNICÍPIO	COORDENADA GPS (latitude/longitude)	ALTITUDE
1 Fazenda Bom Jardim	Aquidauana	S19 17 17.0 W55 14 07.4	147 m
2 Fazenda Anali	Rio Verde do MT	S19 11 30.8 W55 15 46.9	150 m
3 Fazenda Carrapato	Aquidauana	S19 14 30.0 W55 17 47.0	137 m
4 Fazenda Esperança	Aquidauana	S19 28 31.1 W55 16 28.3	166 m
5 Fazenda Bom Viver	Aquidauana	S19 20 48.8 W55 15 37.5	145 m
6 Fazenda Rancho Grande	Aquidauana	S19 17 09.1 W55 12 41.5	142 m
7 Fazenda Renascer	Aquidauana	S19 27 16.1 W55 15 50.5	169 m
8 Estância Colorado	Rio Verde do MT	S19 15 42.9 W55 11 17.3	162 m

Rio Verde do MT – Rio Verde do Mato Grosso

GPS: *Global Position Satellite* (Marca/Modelo Garmin 76CS)

De acordo com Silva e Abdon (1998), a bacia do Alto Paraguai no Brasil foi delimitada e quantificada em 361.666 km² e o Pantanal no Brasil em 138.183 km², ocupando, portanto, 38,21% da área da bacia. Dezesseis municípios participam da área definida pela planície pantaneira (Figura 1). Dos 138.183 Km² de área calculada do Pantanal, 48.865 km² (35,36%) estão no estado do Mato Grosso e 89.318 km² (64,64%) no estado do Mato Grosso do Sul.

Fonte: (SILVA; ABDON, 1998)

Figura 1 - Divisão geopolítica do Pantanal brasileiro. Bacia do Alto Paraguai e Pantanal no Brasil. Malha municipal do Pantanal, 1998.

O Pantanal é dividido em 11 sub-regiões. Os nomes dados a estas sub-regiões foram, na maioria dos casos, os já consagrados pela literatura e pela população local, originários de nomes municipais ou distritos administrativos (SILVA; ABDON, 1998). A maior sub-região pantaneira é a do Paiaguás, com 27.082 km² ou 19,6% da área do Pantanal. Em seguida vêm três sub-regiões, a da Nhecolândia (26.921 Km² ou 19,48%), onde foi realizado este estudo, e as de Barão de Melgaço (13,15%) e Poconé (11,63%) (Figura 2).

A escolha dos municípios foi aleatória, sendo utilizadas coordenadas geográficas (através de aparelho de GPS, *Global Position Satellite*, marca/modelo Garmin 76CS) para que as propriedades estivessem localizadas dentro dos limites geograficamente Pantaneiros (Figura 2).

Fonte: (SILVA;ABDON, 1998)

Figura 2 - Delimitação das sub-regiões do Pantanal brasileiro. Bacia do Alto Paraguai e Pantanal no Brasil, 1998.

Deu-se preferência aos animais mais velhos devido à maior possibilidade de terem entrado em contato com o parasita com o passar do tempo. A maioria dos proprietários não tinha conhecimento da idade exata dos animais, entretanto variou aproximadamente entre dois a seis anos de idade, sendo os machos os animais mais velhos. Quanto ao sexo, foram eutanasiadas 23 galinhas e 17 galos de acordo com a escolha dos proprietários. A identificação individual de cada animal, bem como das propriedades estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2 Distribuição das amostras (numeração e sexo) e localização individual dos animais que participaram do experimento.

	Nº GALINHA	SEXO	PROPRIEDADE	COORDENADAS GEOGRÁFICAS
1	11	M		
2	27	F	(1)	
3	33	F	Fazenda	S19 17 17.0 W55 14 07.4
4	36	F	Bom Jardim	
5	42	F		
9	21	M		
7	26	M	(2)	
8	29	F	Fazenda	S19 11 30.8 W55 15 46.9
9	38	F	Anali	
10	44	F		
11	16	M		
12	17	M	(3)	
13	18	M	Fazenda	S19 14 30.0 W55 17 47.0
14	23	M	Carrapato	
15	28	F		
16	2	F		
17	31	F	(4)	
18	43	F	Fazenda	S19 28 31.1 W55 16 28.3
19	4	F	Esperança	
20	19	F		
21	3	F		
22	12	M	(5)	
23	40	M	Fazenda	S19 20 48.8 W55 15 37.5
24	35	M	Bom Viver	
25	25	M		
26	41	F		
27	1	M	(6)	
28	20	M	Fazenda	S19 17 09.1 W55 12 41.5
29	10	M	Rancho Grande	
30	6	F		
31	46	M		
32	30	F	(7)	
33	24	F	Fazenda	S19 27 16.1 W55 15 50.5
34	7	F	Renascença	
35	48	F		
36	15	M		
37	49	F	(8)	
38	50	F	Estância	S19 15 42.9 W55 11 17.3
39	34	M	Colorado	
40	5	F

Figura 3 Mapa representativo da localização das propriedades rurais que participaram do experimento.

Todas as propriedades que participaram deste experimento eram de grandes criadores de bovinos de corte e possuíam várias outras espécies animais livres em seu habitat como animais domésticos (cães, gatos, patos, gansos, cisnes, etc.) e animais silvestres (veados, ema, etc.). O ambiente onde a maioria dos animais ficava era extremamente úmido e, de acordo com os relatos dos responsáveis esta condição, permanecia assim por aproximadamente oito meses (Figura 4).

Figura 4 Fotos de quatro propriedades rurais que participaram do experimento. **A.** Presença de gatos com as galinhas; **B.** Presença de cães; **C.** Ambiente úmido onde as galinhas permaneciam a maior parte do dia.; **D.** Presença de veados.

4.2 COLHEITA DE SANGUE E EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada através de deslocamento cervical e o sangue colhido diretamente por incisão da veia jugular. Amostras de sangue, coração e o cérebro de cada galinha foram acondicionados individualmente, identificados e conservados no gelo e levados ao laboratório de Doenças Parasitárias do VPS-FMVZ-USP, em São Paulo, no máximo três dias após a eutanásia.

Após a eutanásia e a retirada e acondicionamento do sangue e órgãos que seriam utilizados no experimento, as carcaças eram deixadas com os proprietários para incineração.

4.3 EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*

Os soros das galinhas foram examinados através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987).

A diluição dos soros foi feita em microplaca (96 poços) usando solução salina tamponada, pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH₂PO₄ 0,0026M; NaHPO₄ 0,008M), filtrada em membrana de policarbonato com 1,45µm de porosidade. A seguir, 150µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5 mL de solução alcalina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M; H₃BO₃ 0,05M; NaN₃ 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), 35µL de Mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. O antígeno foi fornecido gentilmente pelo Dr. J. P. Dubey do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, sendo enviado por via aérea.

Essa solução foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25µL de reagentes por poço. Os soros diluídos foram transferidos para essa microplaca e homogeneizados ao reagente (v/v). A placa foi selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada “overnight” à 37°C.

Um resultado negativo foi demonstrado com a formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa e um resultado positivo foi demonstrado através da formação de um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido (DESMONTS; REMINGTON, 1980).

Inicialmente, para triagem dos animais, foram realizadas diluições dos soros em série de 1:5 a 1:40. Neste estudo, os animais com títulos maiores ou iguais a cinco foram considerados positivos (DUBEY et al., 2003a). Os soros dos animais com título maiores ou iguais a 40 foram novamente diluídos e testados até chegar ao título máximo da reação. Foram utilizados controles positivos e negativos previamente conhecidos.

4.4 DIGESTÃO PÉPTICA DOS TECIDOS

Os tecidos cardíacos dos animais soropositivos foram primeiramente cortados em pequenos pedaços. O cérebro e o coração de cada animal foram utilizados integralmente. O material foi utilizado para o bioensaio em camundongo e o protocolo foi de acordo com Dubey (1998). O “pool” de tecidos foi homogeneizado com cinco volumes de NaCl 0,15M (salina), sendo utilizado um homogeneizador de uso doméstico.

Ao material resultante adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1 – 1,2 (pepsina, 2,6g; NaCl, 5,0g; HCl, 7,0mL; água destilada suficiente para completar 500mL de solução), preparados próximo ao uso e aquecidos em banho-Maria a 36,5°C. A mistura foi incubada em banho-Maria a 36,5°C por uma hora sob agitação. Após a incubação, a suspensão foi coada através de duas camadas de gaze e então transferida para cinco tubos cônicos de 50mL e centrifugado a 1.200g por 10 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada tubo foi neutralizado pela adição de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH~8,3, preparado no momento do uso e adicionado aproximadamente 5mL ao tubo. A neutralização foi percebida visualmente através a mudança de cor do sedimento. Após a homogeneização, o material foi então transferido para um único tubo cônico, completando o volume para 50mL com salina e centrifugado a 1.200g por 10 minutos.

Novamente o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi adicionado de igual volume de uma solução salina contendo 2.000U de penicilina e 200mg de estreptomicina por mililitro. Imediatamente, a amostra foi inoculada em um grupo de quatro a seis camundongos, dependendo da quantidade de homogeneizado obtido, na quantidade de 1~1,2 mL por animal por via sub-cutânea.

4.5 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

4.5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados camundongos fêmeas *Balb-c* com aproximadamente dois meses de idade provenientes do Biotério do VPS-FMVZ-USP. Cada grupo foi constituído de quatro a seis camundongos (Tabela 3), alojados na mesma caixa, marcados individualmente em diferentes locais do corpo com ácido pícrico na seqüência das aplicações: 1º - cabeça (CAB); 2º - cauda (CAU); 3º - barriga (BAR); 4º - dorso (DOR); 5º - pata direita (PATd) e 6º - pata esquerda (PATe), sendo então observados duas vezes ao dia durante 30 dias.

Após este período, os mesmos eram observados uma vez ao dia. Todos os camundongos que não vieram a óbito depois de 74 dias da inoculação foram sacrificados e examinados para pesquisa de *T. gondii*. Este sacrifício foi realizado através do deslocamento cervical após prévia sedação com associação de 100mg/Kg de quetamina a 10% com 100mg/Kg de xilazina a 2%, via intraperitoneal. A colheita do sangue foi realizada pelo plexo retro-orbital usando pipeta de Pasteur logo após a sedação dos animais. Os soros obtidos foram examinados através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987), utilizando os mesmos procedimentos quanto às diluições do soro e do antígeno, distribuição na microplaca (96 poços) e leitura, que foram utilizados nos soros das galinhas. Para os soros dos camundongos foi realizada diluição de 1:25. Neste estudo, os animais com títulos maiores ou iguais a esta única diluição foram considerados positivos.

Os animais que morreram foram examinados para pesquisa de *T. gondii* nos tecidos como descrito no item “pesquisa de *T. gondii*” (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação individual das galinhas soropositivas para *Toxoplasma gondii*, numeração dos grupos e número de camundongos inoculados por grupo.

Identificação Galinha	GRUPO	Nº camundongos inoculados
29	G 1	3 (três)
11	G 2	5 (cinco)
48	G 3	5 (cinco)
28	G 4	5 (cinco)
43	G 5	5 (cinco)
31	G 6	5 (cinco)
3	G 7	5 (cinco)
16	G 8	5 (cinco)
1	G 9	5 (cinco)
25	G 10	5 (cinco)
24	G 11	5 (cinco)
38	G 12	5 (cinco)
19	G 13	5 (cinco)
7	G 14	5 (cinco)
4	G 15	5 (cinco)
42	G 16	6 (seis)
27	G 17	6 (seis)
15	G 18	5 (cinco)
33	G 19	6 (seis)
44	G 20	5 (cinco)
49	G 21	6 (seis)
36	G 22	4 (quatro)
18	G 23	6 (seis)
21	G 24	6 (seis)
5	G 25	6 (seis)
20	G 26	6 (seis)
34	G 27	6 (seis)

4.5.2 PESQUISA DE *T. gondii*

Todos os camundongos usados no bioensaio foram examinados para pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito previamente (DUBEY; BEATTIE, 1988). Impressões dos pulmões e fragmentos do cérebro dos animais que morreram foram examinados sob microscopia de luz, entre lâmina e lamínula, para pesquisa de estágios de *T. gondii* (taquizoítos e/ou cistos).

Fragmentos do cérebro dos camundongos sacrificados também foram examinados para pesquisa de cistos de *T. gondii*, conforme descrito anteriormente. Destes camundongos sacrificados foram retirados duas pequenas porções de cérebro, sendo uma de cada hemisfério encefálico, e colocados sob lâmina e lamínula separadamente, ou seja, de cada camundongo sacrificado foram analisadas amostras de cérebro em duplicata. Fragmentos de coração e musculatura esquelética da coxa (que formaram um “pool” chamado apenas musculatura esquelética, ou ME) foram coletados para pesquisa do DNA do parasita.

Um fragmento de pulmão foi cortado, o excesso de sangue na superfície removido, e essa superfície, aplicada sobre uma lâmina com algumas gotas de solução salina, cobrindo-a então com uma lamínula. Fragmentos de cérebro de 3,0 – 5,0mm² foram comprimidos entre lâmina e lamínula e examinados para pesquisa de cistos. No caso dos camundongos eutanasiados, foram examinados fragmentos de cérebro em duplicata de cada animal, conforme descrito anteriormente. Os camundongos em cujos tecidos foram encontrados estágios do parasito foram considerados infectados pelo *T. gondii*.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS PROVAS MOLECULARES

4.6.1 AMOSTRAS SECUNDÁRIAS (AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS)

O pulmão e o cérebro de cada camundongo que morreu de infecção aguda pelo *T. gondii* foram macerados separadamente utilizando-se gral e pistilo. Acrescentou-se a este

material macerado 1,0mL de solução salina estéril e a suspensão obtida foi colocada em microtubo de 2,0mL e armazenada em freezer a -70°C até o processamento para obtenção do DNA.

Quanto aos camundongos sacrificados, os materiais coletados foram cérebro e musculatura esquelética, sendo os mesmos macerados separadamente e acrescentados de 1,0mL de salina estéril (para cada amostra). A partir daí, foram acondicionados individualmente em microtubos de 2,0mL. Ambas as amostras foram armazenadas a - 70°C até o processamento para obtenção do DNA.

4.6.2 AMOSTRAS PRIMÁRIAS (AMOSTRAS DE GALINHAS)

Após a homogeneização dos tecidos das galinhas, antes de acrescentar a pepsina, uma alíquota de 1,5mL de cada amostra foi colocada em microtubo de 2,0mL e armazenada em freezer a -70°C até o processamento para obtenção do DNA. O coração e o cérebro de cada galinha sorologicamente negativa para *T. gondii* foram macerados separadamente utilizando-se gral e pistilo. Acrescentou-se a este material macerado 4,0mL de salina estéril e a suspensão obtida foi colocada em tubos de centrifugação (*Falcon*) e armazenada em freezer a -70°C até o processamento para obtenção do DNA.

4.6.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi baseada nos protocolos descritos por Ausubel et al. (1999).

Após descongelamento das amostras, alíquotas de 200µL e 300µL da suspensão de tecidos dos camundongos e das galinhas respectivamente, foram separadas para se iniciar a extração. O controle positivo utilizado foi a amostra RH (SABIN, 1941) cuja extração originou-se de alíquotas de 100µL de uma suspensão obtida de lavado peritoneal de

camundongos infectados experimentalmente. As extrações foram realizadas em triplicatas com intuito de se aumentar a sensibilidade do teste de detecção de DNA posteriormente.

Adicionou-se a suspensão de órgãos o tampão de extração calculado para um volume final de 500µL (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%; 10µL de proteinase K; água ultrapura autoclavada). Após homogeneização as amostras foram incubadas *overnight* em banho-seco a 37°C e agitação automática de 30 segundos a cada 30 minutos.

Alíquotas de 300µL da amostra foram adicionadas de igual volume de fenol tamponado, homogeneizado e centrifugado a 15.000g por cinco minutos. Após a centrifugação retirou-se o máximo de sobrenadante (fase aquosa) e acrescentou-se igual volume retirado de clorofórmio às amostras, sendo novamente homogeneizadas e centrifugadas a 15.000g por mais cinco minutos.

Após a coleta do sobrenadante (evitando-se o clorofórmio adicionado na etapa anterior) adicionou-se igual volume de propanol absoluto e as amostras foram então congeladas a temperatura de -20°C *overnight* após leve homogeneização.

Após a etapa anterior as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 30 minutos a temperatura de 4°C e o sobrenadante foi então desprezado. Às amostras foi adicionado Etanol 75%, sendo novamente centrifugadas por mais 10 minutos, o sobrenadante descartado e os microtubos ficaram em posição invertida até secarem em temperatura ambiente (tempo aproximado de 30 a 45 minutos).

Para completa secagem e garantia de ausência de resíduos de etanol, os microtubos eram colocados semi-abertos em banho-seco a temperatura de 56°C por mais 30 minutos quando então foram retirados e adicionados de 20µL de TE. A partir daí foram armazenados em freezer a -20°C até amplificação.

4.7 PROVAS MOLECULARES

4.7.1 PCR

Uma suspensão de cérebro e coração de todas as galinhas foi analisada com o emprego da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando o par de *primer* para o gene B1 (F- 5' GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG3' e R- 5'-TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC-3)'. O mesmo foi realizado nos tecidos dos camundongos inoculados, sendo estes analisados em amostras separadas, sendo uma amostra contendo cérebro e outra amostra contendo musculatura esquelética de cada camundongo com o intuito de se verificar a presença de DNA de *T. gondii* nestes locais. Com o emprego da PCR direcionada ao gene B1, visou-se apenas a detecção da presença de *T. gondii* em tecidos animais.

No caso das amostras dos camundongos foi realizado outras PCRs, desta vez com *primers* direcionados a 12 diferentes *loci* (SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3) conforme descrito previamente (SU et al., 2006; PENA et al., 2008). Estas PCRs foram realizadas com ensaios em *nested* e foram empregadas para a identificação genotípica das amostras de *T. gondii* detectadas em camundongos.

Para todos os casos, para uma reação de 50µL, foi utilizada uma solução contendo 31,2µL de água ultrapura autoclavada, 5,0µL de tampão de reação (KCl 50mM: Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 1,0µL da mistura de dNTPs (1,25mM de cada base - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 3,0µL do *primer* senso (10pmol/µL), 3,0µL do *primer* anti-senso (10pmol/µL), 1,5µL de MgCl₂ (50mM) e 0,3µL de *Taq* DNA polimerase para cada 5,0µL de amostra de DNA extraído.

A cada corrida de PCR foi incluído um controle positivo (amostra RH), pelo menos dois controles negativos (água pura autoclavada) além de controle da extração (tampão TE).

A *nested*PCR usada para a identificação genotípica foi realizada a partir dos produtos amplificados de PCR utilizando *primers* internos de todos os marcadores (SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3) conforme descrito previamente (SU et al., 2006; PENA et al., 2008).

Para uma reação de 50µL, foi utilizada uma solução contendo 31,2µL de água ultrapura autoclavada, 5,0µL de tampão de reação (KCl 50mM: Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 1,0µL da mistura de dNTPs (1,25mM de cada base - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 3,0µL do *primer* interno 1 (10pmol/µL), 3,0µL do *primer* interno (10pmol/µL), 1,5µL de MgCl₂

(50mM) e 0,3 μ L de Taq DNA polimerase para cada 5,0 μ L de amostra de DNA amplificado do PCR.

A cada corrida de PCR foi incluído um controle positivo (amostra RH), pelo menos dois controles negativos (água pura autoclavada) além de controle da extração (tampão TE).

4.7.2 CICLO UTILIZADO

Para desnaturação inicial uma vez a 94°C por 30 segundos, já para desnaturação, trinta e nove repetições a 94°C por 20 segundos e para hibridização, extensão e extensão final, 60°C por 25 segundos, 72°C por mais 25 segundos e 72°C por 5 minutos respectivamente.

4.7.3 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

Os produtos originados pelo PCR e *nestedPCR* foram dispostos em um gel de agarose a 2,0% em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M: EDTA 0,001M) juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (*ladder*) sendo então submetidos a eletroforese. De cada amostra foram analisadas alíquotas de 20 μ L. Após a corrida eletroforética o gel era corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 μ g/mL) por aproximadamente 20 minutos sendo após este período, lavado em água destilada e observado sob trans-iluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas geradas.

4.8 RFLP E ANÁLISES GENOTÍPICAS

Formas parasitárias de *T. gondii* foram coletadas do pulmão e líquido peritoneal dos camundongos que morreram e do cérebro de todos os camundongos que sobreviveram até 74 dias após a inoculação. Dos tecidos congelados, o DNA foi extraído, e os tipos de cepa foram avaliados utilizando 12 marcadores genéticos, sendo SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico como descrito previamente (SU et al., 2006). Adicionalmente um novo marcador (PENA et al., 2008) denominado CS3 que está localizado no cromossomo VIIa do *T. gondii* foi incluído no presente estudo.

A sequência do DNA alvo foi primeiramente amplificada por PCR utilizando *primers* externos para todos os marcadores, seguido de *nested*PCR para cada marcador individualmente como descrito anteriormente (SU et al., 2006; PENA et al., 2008). Os detalhes sobre os 12 marcadores moleculares, *primers* (PCR e *nested*PCR) e enzimas de restrição utilizadas estão demonstrados no quadro 4.

A determinação dos genótipos presentes nas amostras analisadas foi feita essencialmente como descrito por Pena et al. (2008). Os dados genotípicos de polimorfismos de restrição foram transformados em dados binários ("0" para ausência de banda e "1" para a presença) e utilizados em programas de análise de variabilidade genética e de reconstrução filogenética. Os programas empregados para as análises genotípicas foram Arlequin 3.11 e Splitstree4 (HUSON, 1998).

Os quatro genótipos detectados neste estudo (ver em Resultados) foram analisados em conjunto com outros genótipos detectados em estudos com galinhas do Brasil. Foi empregado um total de 62 genótipos de *T. gondii*. Dentre estes 62 genótipos, 60 já haviam sido detectados em galinhas. A lista completa dos genótipos empregados nesta análise encontra-se no apêndice C.

Marcador	Primer (PCR) - externos	Primer (<i>nestedPCR</i>) - internos	Enzima Restrição	Referência
C22-8	C22-8F: TGATGCATCCATGCGTTTAT C22-8R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	C22-8F: TCTCTCTACGTGGACGCC C22-8R: AGGTGCTTGGATATTTCGC	<i>BsmAI</i> , <i>MboII</i>	Khan et al (2005); Su et al. (2006)
C29-2	C29-1F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA C29-2R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	C29-2F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC C29-2R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	<i>HpyCH4I</i> V, <i>RsaI</i>	Khan et al (2005); Su et al. (2006)
L358	L358F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC L358R: GCAATTCCTCGAAGACAGG	L358F2: AGGAGGCGTAGCGCAAGT L358R2: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	<i>HaeIII</i> , <i>NlaIII</i>	Khan et al (2005); Su et al. (2006)
SAG1	SAG1F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG SAG1R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	SAG1F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC SAG1R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	<i>Sau96I</i> , <i>HaeII</i>	Grigg et al. (2001); Dubey et al. (2006a)
SAG2 (5' + 3') (Novo SAG2)	SAG2F: GGAACGCGAACAATGAGTTT SAG2R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	SAG2Fa: ACCCATCTGCGAAGAAAACG SAG2Ra: ATTTGACCGAGCGGAGCAC	<i>HinfI</i> , <i>TaqI</i>	Lehmann et al. (2000); Su et al. (2006)
SAG2	SAG2F4: GCTACCTCGAACAGGAACAC SAG2R4: GCATCAACAGTCTTCGTTGC (5' PCR) SAG2F3: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC SAG2R3: TCAAAGCGTGCATTATCGA (3' PCR)	SAG2F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC SAG2R2: GCAAGAGCGAACTTGAACAC (5' <i>nPCR</i>) SAG2F2: ATTCTCATGCCTCCGCTTC SAG2R: AACGTTTCACGAAGGCACAC (3' <i>nPCR</i>)	<i>Sal 3AI</i> , <i>HhaI</i>	Howe et al. (1997)
SAG3	SAG3F: CAACTCTCACCATTCCACCC SAG3R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	SAG3F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA SAG3R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	<i>Nci I</i>	Grigg et al., (2001)
GRA6	GRA6F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GRA6R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	GRA6F1: TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6R1x: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	<i>Mse I</i>	Fazeli et al. (2000); Su et al. (2006)
BTUB	BTUBF: TCCAAAATGAGAGAAATCGT BTUBR: AAATTGAAATGACGGAAGAA	BTBF: GAGGTCATCTCGGACGAACA BTBR: TTGTAGGAACACCCGGACGC	<i>BsiEI</i> , <i>TaqI</i>	Khan et al (2005); Su et al. (2006)
PK1	PK1F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA PK1R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	PK1F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT PK1R: TCATCGCTGAATCTCATTCG	<i>AvaI</i> , <i>RsaI</i>	Khan et al (2005); Su et al. (2006)
Apico	APICOF: TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG APICOR: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	APICOF: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT APICOR: GGGATTCGAACCCCTTGATA	<i>AflIII</i> , <i>DdeI</i>	Su et al. (2006)
CS3	CS3F: GTGTATCTCCGAGGGGGTCT CS3R: TGTGACTTCTTCGCATCGAC	CS3F: AGCGGATTTCCAACACTGTC CS3R: CTGCTGCATTCACAACTCC	<i>NlaIII</i> , <i>MboI</i>	Pena et al. (2008)

Quadro 4 - Distribuição dos marcadores moleculares, oligonucleotídeos (*primers*) e enzimas de restrição utilizados neste estudo.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Associações entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* nas galinhas com os resultados das análises moleculares (PCR) nas amostras primárias e associação dos isolamentos nos camundongos em relação ao sexo foram verificadas através do teste Qui-quadrado (programa Minitab 15).

Possíveis associações entre títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas e isolamento do parasita nos bioensaios foram verificados através do Teste da Mann-Whitney pelo mesmo programa estatístico citado anteriormente.

As análises de correlação simples entre a frequência de isolados nos camundongos (percentagem de isolamentos dos camundongos do mesmo grupo) e os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas foram realizadas pelo programa Excel (Microsoft Office Excel, versão 2003).

A comparação entre o número de grupos com camundongos sobreviventes e o número de grupos sem camundongos sobreviventes foi feita através do teste Exato de Fisher através do Programa EPI-INFO 6.0. A comparação de proporções (*comparison of proportions*) e os índices de concordância estatística (*kappa coefficient calculation*) foram obtidos através do programa EPITABLE (EPI-INFO 6.0).

O teste de Q-quadrado e o valor de p das análises de tabelas simples e estratificadas foram realizadas com auxílio do programa STATCALC (EPIINFO 6.0).

Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 SOROLOGIA DAS GALINHAS – MAT

Vinte e sete amostras (67,5%) foram sorologicamente positivas para *T. gondii* e 13 (32,5%) foram negativas.

Das amostras soropositivas, sete (25,9%) foram positivas na diluição 1:5, três (11,1%) na diluição 1:10, duas (7,4%) na diluição 1:20, três (11,1%) na diluição 1:320, uma (3,7%) na diluição 1:640, três (11,1%) na diluição 1:1.280, duas (7,4%) na diluição 1:2.560, quatro (14,8%) na diluição 1:5.120 e duas (7,4%) na diluição 1:10.240 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Teste de Aglutinação Modificado (MAT) para *Toxoplasma gondii*. Número de galinhas soropositivas e frequência absoluta em diversas diluições de soros de galinhas do Pantanal, MS, Brasil.

De todas as propriedades cujas amostras foram coletadas, havia pelo menos um animal soropositivo em cada uma delas (100%). De todos os animais avaliados a soropositividade no MAT foi maior nas fêmeas (78,3%) do que nos machos (52,9%) (Tabela 4), entretanto, esta diferença não foi significativa ($p=0,091$).

A frequência relativa dos animais positivos para *T. gondii* entre todas as propriedades avaliadas variou entre 40 e 100%. Entre as amostras positivas os títulos mais encontrados foram entre 5 e 20 (com 12 animais positivos), seguindo-se sete animais positivos nas titulações entre 320 e 1.280 e oito positivos nas titulações entre 2.560 e 10.540 (Tabela 5).

Tabela 4 - Resultado da sorologia para *Toxoplasma gondii* pelo MAT nas amostras de galinhas, diluição máxima encontrada, sexo e propriedade rural onde se localizava cada animal

(continua)

	Galinha	Resultado MAT	Título MAT	Sexo	Propriedade
1	11	Positivo	5120	M	1
2	27	Positivo	320	F	1
3	33	Positivo	5	F	1
4	36	Positivo	5	F	1
5	42	Positivo	2560	F	1
6	21	Positivo	5	M	2
7	26	Negativo	0	M	2
8	29	Positivo	5120	F	2
9	38	Positivo	2560	F	2
10	44	Positivo	5	F	2
11	16	Positivo	20	M	3
12	17	Negativo	0	M	3
13	18	Positivo	5	M	3
14	23	Negativo	0	M	3
15	28	Positivo	320	F	3
16	2	Negativo	0	F	4
17	4	Positivo	20	F	4
18	19	Positivo	5120	F	4
19	31	Positivo	320	F	4
20	43	Positivo	10240	F	4

Tabela 4 - Resultado da sorologia para *Toxoplasma gondii* pelo MAT nas amostras de galinhas, diluição máxima encontrada, sexo e propriedade rural onde se localizava cada animal

(conclusão)					
	Galinha	Resultado MAT	Título MAT	Sexo	Propriedade
21	3	Positivo	1280	F	5
22	12	Negativo	0	M	5
23	25	Positivo	10240	M	5
24	35	Negativo	0	M	5
25	40	Negativo	0	M	5
26	1	Positivo	640	M	6
27	6	Negativo	0	F	6
28	10	Negativo	0	M	6
29	20	Positivo	10	M	6
30	41	Negativo	0	F	6
31	7	Positivo	1280	F	7
32	24	Positivo	5120	F	7
33	30	Negativo	0	F	7
34	46	Negativo	0	M	7
35	48	Positivo	1280	F	7
36	5	Positivo	5	F	8
37	15	Positivo	10	M	8
38	34	Positivo	10	M	8
39	49	Positivo	5	F	8
40	50	Negativo	0	F	8

Tabela 5 - Número e frequência relativa de animais positivos para *Toxoplasma gondii* pelo MAT nas diferentes diluições entre as propriedades rurais estudadas

Prop.	Positivo/ Total	F.R (%)	Diluição das amostras			
			1:5 - 1:20	1:40 - 1:160	1:320 - 1:1280	1:2560 - 1:10240
1	5/5	100	2/5	0/5	1/5	2/5
2	4/5	80	2/5	0/5	0/5	2/5
3	3/5	60	2/5	0/5	1/5	0/5
4	4/5	80	1/5	0/5	1/5	2/5
5	2/5	40	0/5	0/5	1/5	1/5
6	2/5	40	1/5	0/5	1/5	0/5
7	3/5	60	0/5	0/5	2/5	1/5
8	4/5	80	4/5	0/5	0/5	0/5

Prop. - Propriedade Rural

F.R (%) – Frequência Relativa (%)

5.2 RESULTADO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) NAS AMOSTRAS PRIMÁRIAS DE GALINHAS

Do “pool” de amostras (cérebro e coração) de galinhas analisadas, 16 (40%, IC = 24,8 – 56,7) apresentaram bandas eletroforéticas compatíveis com *T. gondii*. Entretanto, dos tecidos dos animais soropositivos (27 galinhas) esse número representou 59,26% das galinhas. Das oito propriedades cujas amostras foram coletadas, havia pelo menos um animal PCR positivo em sete (87,5%) delas. Na tabela 6 e no gráfico 2 estão demonstradas as proporções de animais soropositivos (separados por titulação no MAT) e soronegativos entre os animais positivos na PCR.

Tabela 6 - Quantidade de galinhas positivas na PCR entre as galinhas soronegativas e soropositivas (dentre as titulações encontradas no MAT)

	Positividade/ Título MAT	Galinhas PCR Positivas	Galinhas PCR Negativas	Total
POSITIVO	5	0	7	7
	10	0	3	3
	20	1	1	2
	320	3	0	3
	640	1	0	1
	1.280	3	0	3
	2.560	2	0	2
	5.120	4	0	4
	10.240	2	0	2
	NEGATIVO (MAT)	0	13	13
Total Galinhas		16	24	40

Gráfico 2 - Proporção de galinhas positivas e negativas na PCR entre as galinhas soropositivas no MAT nas diversas diluições. Os valores acima das barras indicam as percentagens de galinhas positivas na PCR entre as galinhas positivas no MAT.

Na Tabela 7 está demonstrada a distribuição das propriedades de onde as galinhas se originaram de acordo com o resultado da PCR. Para melhor visualização e comparação entre as frequências de galinhas positivas para *T. gondii* nas duas técnicas, no Quadro 5 se encontra a distribuição destas frequências.

Tabela 7 - Número e frequência relativa de animais positivos para *Toxoplasma gondii* pela PCR nas diferentes diluições entre as propriedades rurais estudadas

Prop.	Positivo/ Total	F.R PCR (%)	Diluição das amostras			
			1:5 - 1:20	1:40 - 1:160	1:320 - 1:1.280	1:2.560 - 1:10.240
1	3/5	60	0/2	0/0	1/1	2/2
2	2/5	40	0/2	0/0	0/0	2/2
3	1/5	20	0/2	0/0	1/1	0/0
4	4/5	80	1/1	0/0	1/1	2/2
5	2/5	40	0/0	0/0	1/1	1/1
6	1/5	20	0/1	0/0	1/1	0/0
7	3/5	60	0/0	0/0	2/2	1/1
8	0/5	0	0/4	0/0	0/0	0/0

Prop. - Propriedade Rural

Positivo/Total: número de reações positivas na PCR entre total de galinhas avaliadas de cada propriedade

F.R PCR (%) – Frequência Relativa (%) de animais positivos na técnica de PCR

Diluição das amostras: número de reações positivas na PCR entre os positivos na MAT, separadas entre as diversas diluições.

Galinhas	PCR positivas	PCR negativas	
MAT positivas	16	11	27
MAT negativas	0	13	13
	16	24	40

($Q^2 = 12,84$; $p < 0,001$)

$Kappa = 0,486$; concordância regular

Quadro 5 Razão das diferenças do número de galinhas positivas e negativas nos Testes de Aglutinação Modificado (MAT, ponto de corte 1:5) e Reação em Cadeia pela polimerase (PCR).

Ao comparar as frequências relativas de galinhas positivas nos Testes de Aglutinação Modificado (MAT), considerando como ponto de corte a diluição 1:5, e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) notou-se uma correlação positiva, porém ínfima ($R^2 = 0,0952$, sendo $y = 0,25x + 57,5$, onde R^2 = coeficiente de determinação) entre as frequências de animais positivos na PCR e positivos no MAT, ou seja, a variação das frequências relativas encontradas no MAT é explicada em apenas 9,52% pela variação das frequências encontradas na PCR (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Correlação entre as frequências relativas de galinhas positivas no Teste de Aglutinação Modificado e galinhas positivas pela Reação em Cadeia pela Polimerase, sendo representado pelo quadrado do coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,386$) R^2 .

Ao considerar a técnica de PCR como “padrão ouro”, ou seja, admitirmos que os animais positivos por esta técnica sejam animais sabidamente infectados e os negativos os sabidamente não infectados e comparamos os resultados da sorologia nestes mesmos animais, conclui-se que a sensibilidade do diagnóstico, por MAT, da infecção por *T. gondii* em galinhas é de 100% e a especificidade é de apenas 54,2%, considerando o ponto de corte a diluição 1:5. Entretanto, ao elevarmos o ponto de corte no MAT para 1:40, tem-se uma menor sensibilidade (93,8%) e uma especificidade de 100% (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Sensibilidade e especificidade do MAT para *Toxoplasma gondii* em soro de galinhas, considerando os resultados positivos na PCR como galinhas sabidamente infectadas, em dois pontos de corte distintos (1:5 e 1:40) no MAT.

Em relação ao sexo dos animais, a relação de positividade (aparecimento das bandas compatíveis com o *T. gondii*) foi similar ao encontrada na sorologia, ou seja, apesar das fêmeas serem em maior número, sendo 13 galinhas (56,6% do total de 23 animais avaliados) e 3 galos (17,6 % do total de 17 animais avaliados) a diferença entre a positividade deste teste entre os sexos não foi significativa ($p = 0,18$).

A relação soropositividade no MAT e detecção de DNA nas amostras dos animais, que foi (conforme descrito anteriormente) de aproximadamente 59%, foi maior nas fêmeas (72,2%) do que nos machos (33,3%) (Gráfico 5). Provavelmente devido ao pequeno número de amostras, esta diferença não foi significativa ($p = 0,127$).

Gráfico 5 Relação de positividade na PCR comparada à sorologia no MAT nos machos (galos) e fêmeas (galinhas).

5.3 BIOSSENSAIO EM CAMUNDONGOS E ISOLAMENTO DE *T. gondii*

5.3.1 INFECÇÃO AGUDA NOS CAMUNDONGOS

Dos 141 camundongos inoculados, seis (4,25%) vieram a óbito logo após a inoculação (de 30 minutos a menos de 24 horas). Os seis camundongos pertenciam aos grupos G4, G5, G8, G11 e G13, sendo dois camundongos mortos do Grupo G11. A morte deveu-se, provavelmente, a um estresse no momento das inoculações, visto que a partir do 14º grupo não houve mais mortes logo após as injeções.

Seis camundongos (4,44%) morreram de toxoplasmose aguda entre os dias 15 e 23 após a inoculação. A infecção foi confirmada pela observação de taquizoítos em líquido peritoneal, pulmão e fígado através de microscópio óptico comum em um aumento de 400X.

Os detalhamentos dos camundongos que morreram da infecção aguda bem como o período dos óbitos estão demonstrados abaixo na tabela 8.

Tabela 8 - Identificação individual dos camundongos que vieram a óbito, grupo a que pertenciam e período do óbito após a inoculação.

Identificação camundongo	Grupo	Morte (dias pós inoculação)
PAT	G11	15
CAB	G11	16
BAR	G11	17
CAB	G1	18
DOR	G1	22
CAU	G1	23

O título de anticorpos anti-*T. gondii* de ambas as galinhas cujos tecidos foram inoculados nos camundongos que morreram foi de 5.120 (galinhas 24 e 29, inoculadas nos camundongos dos grupos G1 e G11, respectivamente).

A confirmação também ocorreu através da detecção de material genético do parasita no material coletado (líquido peritoneal, pulmão, fígado, coração e cérebro) pelo Teste de

PCR. Os seis camundongos que vieram a óbito pertenciam a apenas dois grupos (G1 e G11) correspondendo a 7,4% dos 27 grupos formados.

5.3.2 INFECÇÃO CRÔNICA NOS CAMUNDONGOS

Os camundongos que sobreviveram foram eutanasiados após 74 dias e fragmentos de seus cérebros em duplicata foram analisados por método direto à procura de cistos contendo bradizoítos de *T. gondii*. Dos 129 camundongos sobreviventes foram encontrados cistos em 28 cérebros de 10 grupos distintos (Figura 5, Tabela 9).

Bradizoítos (setas) - Fragmentos de cérebros entre lâmina e lamínula. Aumento de 400X. Microscópio óptico comum.

Figura 5 Cistos de bradizoítos isolados dos cérebros de camundongos bioensaiados.

Como foram analisadas duas lâminas de cada camundongo, correspondente as duas porções cerebrais retiradas de cada animal após o sacrifício, foram analisadas um total de 258

lâminas, considerando que cada grupo sacrificado continha de 4 a 6 camundongos, gerando de 8 a 12 lâminas por grupo respectivamente.

A quantidade de lâminas positivas por grupo, número de camundongos cujos cérebros foram encontrados cistos de bradizoítos e titulação das galinhas cujos tecidos foram inoculados nesses animais estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 Distribuição dos grupos de camundongos (infecção crônica) inoculados, número de lâminas contendo cistos com bradizoítos, número de camundongos por grupo cujos cérebros foram encontrados cistos e título da sorologia para *Toxoplasma gondii* nas galinhas.

GRUPO	Lâminas (<i>imprints</i> de cérebro)		Camundongos		MAT Título (galinhas)
	Nº lâminas com cistos	Total de lâminas visualizadas	Nº camundongos com cistos (cérebro)	Total de camundongos do grupo	
G2	3	10	3	5	5120
G3	4	10	3	5	1280
G4	0	8	0	4*	320
G5	3	8	2	4*	10240
G6	5	10	3	5	320
G7	6	10	4	5	1280
G8	0	8	0	4*	20
G9	6	10	5	5	640
G10	2	10	2	5	10240
G12	0	10	0	5	2560
G13	0	8	0	4*	5120
G14	2	10	2	5	1280
G15	0	10	0	5	20
G16	3	12	3	6	2560
G17	1	12	1	6	320
G18	0	10	0	5	10
G19	0	12	0	6	5
G20	0	10	0	5	5
G21	0	12	0	6	5
G22	0	8	0	4	5
G23	0	12	0	6	5
G24	0	12	0	6	5
G25	0	12	0	6	5
G26	0	12	0	6	10
G27	0	12	0	6	10
TOTAL	35	258	28	129	-

* Foram inoculados um total de cinco camundongos, porém, um de cada grupo morreu logo após a inoculação.

No gráfico 6 podem ser observadas as proporções de camundongos com cistos contendo bradizoítos nos cérebros mortos 74 dias após a inoculação segundo os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas.

Gráfico 6 - Frequência de camundongos com bradizoítos nos cérebros segundo os títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* das galinhas.

Observou-se uma diferença estatística muito significativa entre a frequência da ocorrência de cistos nos cérebros dos camundongos e o título de anticorpos das galinhas ($p < 0,0001$, $Q2 = 52,87$). Altos títulos nas galinhas foram associados com um maior número de camundongos com cistos de bradizoítos nos cérebros, apesar da moderada correlação entre eles ($r = 0,21$).

Entretanto, quando comparamos as proporções de camundongos com cistos nos cérebros entre os diversos grupos, identificamos uma maior frequência de camundongos com

cistos que foram inoculados com tecidos de galinhas com título de anticorpos anti-*T. gondii* 640, quando comparados a praticamente todos os outros títulos das galinhas (Tabela 10). Este título, apesar de alto, não foi o maior encontrado entre as galinhas. Entretanto, pode-se observar uma maior frequência de camundongos com cistos provenientes mais de galinhas com médios títulos (640, 1.280) do que com altos títulos de anticorpos (5.120 e 10.240).

Tabela 10 Valores de p* resultantes da comparação das proporções de camundongos com cistos nos cérebros inoculados com tecidos de galinhas de diferentes títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

Títulos	Títulos anticorpos anti- <i>T. gondii</i>							
	5	10	20	320	640	1280	2560	5120
5	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
320	< 0,05	0,081	0,258	-	-	-	-	-
640	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,05	-	-	-	-
1280	< 0,001	< 0,001	< 0,05	0,065	0,260	-	-	-
2560	< 0,05	0,098	0,284	0,680	< 0,05	0,098	-	-
5120	< 0,05	0,059	0,206	0,908	0,064	0,399	0,844	-
10240	< 0,05	< 0,05	0,088	0,655	0,134	0,751	0,741	0,999

P < 0,05 (diferente estatisticamente).

No presente estudo foram realizados PCR(s) de todos os cérebros dos camundongos que não vieram a óbito por infecção aguda, independentemente do achado de cistos de bradizoítos de *T. gondii* em seus cérebros ou do resultado da sorologia.

Portanto, entende-se por isolados, amostras que continham formas biológicas de *T. gondii* visualizadas nas lâminas e que tiveram fragmentos gênicos específicos deste parasito amplificados e detectados pela PCR.

Assim sendo, a partir das galinhas positivas, foram realizados 27 bioensaios em 141 camundongos e obtidos 11 (40,7%) isolados, considerando cada isolado, uma galinha. Dos 27 bioensaios nove eram provenientes de tecidos de galos e 18 de galinhas. As frequências relativas de isolamento nos camundongos foram de 33,3% nos galos (sendo 3 galos com 12 camundongos positivos) e 44,44% nas galinhas (sendo 8 galinhas com 24 camundongos positivos).

Um maior número de isolamentos (número de camundongos de um mesmo grupo positivos na PCR entre o total inoculado) ocorreu nos camundongos que foram inoculados com tecidos de galinhas que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, sendo estes 640, 1.280, 10.240 e 5.120 com respectivamente 80, 66,7, 66,7 e 41,2% dos camundongos inoculados apresentando isolamentos ($p < 0,0001$; $Q^2 = 67,7$).

No entanto, ao analisarmos a correlação entre as percentagens de camundongos positivos (isolados no mesmo grupo) e os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas, observou-se uma correlação positiva substancial (0,546) entre eles.

Com o intuito de comparação entre as titulações das galinhas e o resultado do PCR nas mesmas, com a quantidade de isolamentos obtidos e o tipo de manifestação clínica nos camundongos (aguda com óbito ou crônica), segue abaixo a Tabela 11 com a demonstração destes parâmetros. Notamos que as infecções agudas nos camundongos foram originadas pela inoculação de órgãos de galinhas de duas diferentes propriedades rurais, porém com a mesma titulação no MAT (5120). A frequência de isolamento nas propriedades estudadas variou entre 0 a 60% (Tabela 11).

Infecções crônicas em camundongos foram observadas em nove grupos (33,3%) de cinco propriedades diferentes. Destes nove grupos foram obtidos 32 isolamentos (22,7%, sendo cada camundongo, um isolado) provenientes de análise por PCR de amostra de cérebro dos camundongos inoculados. A titulação mínima observada nas galinhas para que fosse observada positividade na PCR nos tecidos dos camundongos inoculados foi de 320. Os resultados individuais de todos os camundongos inoculados podem ser visualizados no apêndice B.

Tabela 11 - Frequência de isolamentos nos camundongos comparado aos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas galinhas e resultados da PCR nos tecidos das galinhas e dos camundongos

(continua)

Galinha	Propriedade (frequência isolamentos)	Grupo (camundongo)	MAT Título (galinhas)	Isolamento (n° de camundongos PCR positivo / TI*)	MC/ DPI
11	1 (40%)	G2	5.120	4/5	Crônica
27		G17	320	0/6	NI
33		G19	5	0/6	NI
36		G22	5	0/4	NI
42		G16	2.560	1/6	Crônica
21	2 (20%)	G24	5	0/6	NI
26		n/b	negativo	n/b	NI
29		G1	5.120	3/3	18-24 (100% óbito)
38		G12	2.560	0/5	NI
44		G20	5	0/5	NI
16	3 (0%)	G8	20	0/4**	NI
17		n/b	negativo	n/b	NI
18		G23	5	0/6	NI
23		n/b	negativo	n/b	NI
28		G4	320	0/4**	NI
2	4 (40%)	n/b	negativo	n/b	NI
4		G15	20	0/5	NI
19		G13	5.120	0/4**	NI
31		G6	320	4/5	Crônica
43		G5	10.240	3/4**	Crônica
3	5 (40%)	G7	1.280	5/5	Crônica
12		n/b	negativo	n/b	NI
25		G10	10.240	5/5	Crônica
35		n/b	negativo	n/b	NI
40		n/b	negativo	n/b	NI

DPI – Dias pós-inoculação

MC – Manifestação clínica (morte aguda ou infecção crônica). Infecção crônica observada 74 DPI.

n/b – não realizado Bioensaio

TI* - Total de camundongos inoculados

NI – não obtido isolamento

** Cinco camundongos inoculados, sendo um óbito logo após a inoculação

Tabela 11 - Frequência de isolamentos nos camundongos comparado aos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas galinhas e resultados do PCR nos tecidos das galinhas e dos camundongos

					(conclusão)
Galinha	Propriedade (frequência isolamentos)	Grupo (camundongo)	MAT Título (galinhas)	Isolamento (nº de camundongos PCR positivo / TI*)	MC/ DPI
1	6 (20%)	G9	640	4/5	Crônica
6		n/b	negativo	n/b	NI
10		n/b	negativo	n/b	NI
20		G26	10	0/6	NI
41		n/b	negativo	n/b	NI
7	7 (60%)	G14	1.280	2/5	Crônica
24		G11	5.120	3/3***	15-17 (100% óbito)
30		n/b	negativo	n/b	NI
46		n/b	negativo	n/b	NI
48		G3	1.280	4/5	Crônica
5	8 (0%)	G25	5	0/6	NI
15		G18	10	0/5	NI
34		G27	10	0/6	NI
49		G21	5	0/6	NI
50		n/b	negativo	n/b	NI

DPI – Dias pós-inoculação

MC – Manifestação clínica (morte aguda ou infecção crônica). Infecção crônica observada 74 DPI.

n/b – não realizado Bioensaio

TI* - Total de camundongos inoculados

NI – não obtido isolamento

*** Cinco camundongos inoculados, sendo dois óbitos após a inoculação.

Das 27 galinhas utilizadas para a realização dos bioensaios, 16 delas foram positivas na PCR. Conforme relatado anteriormente, alíquotas de amostra de coração e cérebro destas galinhas foram separadas anteriormente ao bioensaio e congeladas para realização destas análises pela PCR. Entretanto, destas 16 galinhas PCR positivas que formaram 16 grupos de camundongos para os bioensaios, somente 11 delas originaram isolamentos de *T. gondii*. Na tentativa de detectar *T. gondii* dos outros cinco grupos de camundongos inoculados com os

tecidos das galinhas positivas na PCR, amostras de musculatura esquelética (“pool” de coração + fragmento de músculo da coxa esquerda), foram analisadas por PCR (G4, G15, G12, G13 e G17). Os cinco grupos avaliados totalizaram 24 camundongos. Apenas em um camundongo (o camundongo G17^{cau}), inoculado com uma galinha de título 320 no MAT, foi possível visualizar uma estrutura em um fragmento de cérebro semelhante a um cisto contendo bradizoítos de *T. gondii*. Entretanto, nenhuma das amostras analisadas (cérebro e ME) foi positiva na PCR (Apêndice A).

Dos 129 camundongos inoculados 33 (25,6%) foram positivos para *T. gondii* no MAT (1:25). Não houve diferença estatística entre o número de camundongos positivos na PCR e o número de camundongos positivos no MAT entre camundongos inoculados com galinhas de mesmo título de anticorpos no MAT ($p = 0,986$).

Dos 32 camundongos positivos na PCR, apenas 28 foram também positivos no MAT (87,5%). Além disso, cinco camundongos dos 97 negativos na PCR (5,2%) foram positivos para *T. gondii* no MAT. A razão das diferenças entre o número de camundongos positivos e negativos no MAT e PCR estão demonstrados no Quadro 6.

Camundongos	PCR positivos	PCR negativos	
MAT positivos	28	5	33
MAT negativos	4	92	96
	32	97	129

($Q^2 = 85,7$; $p < 0,0001$)

Kappa: 0,815; concordância ótima

Quadro 6 - Razão das diferenças entre o número de camundongos inoculados soropositivos e soronegativos no MAT e positivos e negativos na PCR.

Os quatro camundongos PCR positivos e MAT negativos eram provenientes de quatro grupos distintos (G3, G5, G6 e G14) sendo os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas cujos tecidos foram inoculados nestes camundongos variando entre 320 a 10.240. Além das amostras serem positivas na PCR, foram encontrados cistos nos cérebros de dois camundongos dos grupos G3 (G3^{pat}) e G14 (G14^{pat}).

Já os cinco camundongos positivos no MAT e negativos na PCR eram de cinco grupos também distintos (G2, G3, G6, G14 e G21) e os títulos das galinhas entre 5 e 5120 (Tabela 12).

Tabela 12 Distribuição individual dos camundongos simultaneamente positivos na PCR e negativos no MAT e negativos na PCR e positivos no MAT, resultados da PCR e título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* das galinhas cujos tecidos foram inoculados nos camundongos, presença de cistos nos cérebros dos camundongos inoculados e frequência de isolamentos (pela PCR) dentro de cada grupo.

Camundongo	Frequência de isolamentos no Grupo (PCR)	Camundongos		Galinhas		Cistos cérebro (camundongo)
		MAT (1:25)	PCR	MAT (título)	PCR	
G3 ^{pat}	80%	–	⊕	1.280	⊕	Sim
G5 ^{dor}	75%	–	⊕	10.240	⊕	Não
G6 ^{pat}	75%	–	⊕	320	⊕	Não
G14 ^{pat}	20%	–	⊕	1.280	⊕	Sim
G2 ^{dor}	80%	⊕	–	5.120	⊕	Sim
G3 ^{cab}	80%	⊕	–	1.280	⊕	Não
G6 ^{dor}	80%	⊕	–	320	⊕	Sim
G14 ^{dor}	40%	⊕	–	1.280	⊕	Sim
G21 ^{pate}	0%	⊕	–	5	–	Não

Quando comparamos os achados de cistos de bradizoítos nos cérebros dos camundongos inoculados com os resultados do PCR de amostras destes mesmos cérebros e

ainda comparamos com os resultados da sorologia (MAT) dos camundongos, notamos algumas discrepâncias. Dos 28 camundongos cujos cistos foram encontrados em seus cérebros, sete destes foram negativos na PCR e entre estes sete animais havia quatro que também não reagiram sorologicamente com antígenos de *T. gondii* no Teste de Aglutinação Modificado (MAT). Estes quatro animais foram inoculados com tecidos de galinhas com altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* (acima de 320).

Para melhor visualização entre os resultados da sorologia dos camundongos bioensaiados com os achados de cistos e do PCR, e a comparação destes resultados com os títulos das galinhas, segue tabela abaixo que demonstra a distribuição das frequências de isolamentos e resultados do MAT dos camundongos dentro de cada titulação encontrada nas galinhas soropositivas e utilizadas no bioensaio (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequências de isolamento e de soropositividade para *Toxoplasma gondii* pelo MAT entre o total de camundongos bioensaiados distribuídos entre os diversos títulos das galinhas.

Título Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (galinhas)	Nº camundongos bioensaiados	% isolamentos nos camundongos (PCR positivo)	% camundongos positivos (MAT) 1:25
5	39	0 ^a	2,6 ^a
10	17	0 ^a	0 ^a
20	9	0 ^{a,b,e}	0 ^a
320	15	26,7 ^{b,d}	26,7 ^{a,b}
640	5	100 ^{c,f}	80 ^b
1.280	15	60 ^{d,f}	73,3 ^b
2.560	11	27,3 ^{b,d}	9,1 ^c
5.120	9	33,3 ^{b,d}	55,6 ^{b,c}
10.240	9	44,4 ^{e,d}	77,8 ^b

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças estatisticamente significativas no teste de Chi-Quadrado ($p < 0,05$).

Correlação positiva muito forte ($r = 0,87$) foi encontrada ao analisarmos os resultados expressos na tabela acima, ou seja, as altas percentagens de camundongos encontrados com cistos em seus cérebros estão relacionados às altas percentagens de camundongos soropositivos no MAT, dentro dos mesmos títulos de anticorpos anti-*T.gondii* das galinhas (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Correlação entre as frequências de isolamentos nos camundongos inoculados e camundongos positivos no MAT, sendo representado pelo quadrado do coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,87$) R^2 .

Maior frequência de camundongos soropositivos no MAT foi encontrada entre os grupos inoculados com órgãos de galinhas cujos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* foram 640

(80%), 10.240 (77,8%) e 1.280 (73,3%), conforme demonstrado na tabela 13 ($Q^2 = 64,24$, $p < 0,0001$).

Comparando ainda os resultados da sorologia dos camundongos inoculados com outros resultados encontrados, a correlação entre a percentagem de camundongos positivos no MAT em relação ao título das galinhas cujos órgãos foram inoculados nestes camundongos sustenta a correlação média (cerca de 50%) encontrada entre a frequência de isolados nos camundongos (pela PCR) com os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas. Correlação positiva substancial ($r = 0,5442$) foi encontrada entre estes dois parâmetros avaliados, reforçando os achados anteriores (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Correlação entre a frequência de camundongos soropositivos para *Toxoplasma gondii* e os títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* das galinhas pelo MAT, sendo representado pelo quadrado do coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,5442$), R^2 .

Em página anterior, na tabela 10, foi exposta a comparação das proporções da frequência de camundongos com cistos nos cérebros entre os diversos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas. Neste caso, encontramos diferenças muito significativas ($p < 0,001$) e/ou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os achados de cistos nos camundongos inoculados com tecidos de galinhas de títulos 640 e 1.280 principalmente.

Corroborando com estes achados, ao analisarmos as diferenças estatísticas entre as comparações do número de camundongos soropositivos no MAT e os distintos títulos de anticorpos das galinhas inoculadas nestes camundongos, verificamos também diferenças muito significativa e significativa nos títulos 640 e 1.280 além dos títulos 5.120 e 10.240 (Tabela 14), ou seja, um maior número de camundongos soropositivos no MAT foi identificado entre os grupos de camundongos inoculados com galinhas cujos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* no MAT foram de 640, 1.280 e 10.240.

Tabela 14 Valores de p^* resultantes da comparação das proporções dos números de camundongos soropositivos no MAT entre os diferentes títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* encontrados nas galinhas pela mesma técnica sorológica.

Títulos	Títulos anticorpos anti- <i>T. gondii</i>							
	5	10	20	320	640	1280	2560	5120
5	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
320	0,027	0,258	0,258	-	-	-	-	-
640	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,144	-	-	-	-
1280	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,05	0,765	-	-	-
2560	0,411	0,414	0,999	0,535	< 0,05	< 0,05	-	-
5120	< 0,001	< 0,05	< 0,05	0,327	0,739	0,655	0,194	-
10240	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,05	0,560	0,808	< 0,05	0,617

$P < 0,05$ (diferença estatisticamente significante).

5.4 ANÁLISES GENOTÍPICAS

Através da análise do polimorfismo do DNA revelado pelos marcadores após digestão com as respectivas enzimas de restrição, cinco genótipos foram revelados nos 11 isolados de galinhas de cinco propriedades do município de Aquidauana e de uma propriedade (Propriedade 2) do município de Rio Verde do Mato Grosso.

Os resultados da genotipagem dos isolados bem como a identificação das amostras primárias originadas estão sumarizados na tabela 15.

Infecção mista foi encontrada em um isolado, denominado TgCkBr198 que demonstrou um complexo cujos padrões são uma mistura de dois alelos observado nos oito *loci*. Este genótipo foi virulento para os camundongos, sendo que todos os animais morreram entre 18 a 24 dias após a inoculação.

Dois genótipos inéditos foram detectados e denominados #59 e #60. Os isolados classificados com estes genótipos tiveram comportamento biológico em camundongos bastante divergentes. Enquanto os isolados de genótipo #59 (TgCkBr188, 189, 190, 191, 192 e 193) não foram letais, o isolado pertencente ao genótipo #60 (TgCkBr197) causou óbito em 100% dos camundongos infectados.

Nenhuma linhagem clonal do Tipo I, II ou III foi encontrada. Apenas a linhagem clonal Brasileira do tipo BrIII (genótipo #30) foi detectada em dois isolados da mesma propriedade (TgCk194 e 195). A identificação do genótipo arquétipo BrIII encontrado neste estudo através das análises genotípicas dos isolados TgCkBr194 e 195 vem confirmar a hipótese de caráter clonal deste genótipo, demonstrado com os achados anteriores em isolados de galinhas nos estados de São Paulo (TgCkBr7, 11 e 17) (DUBEY et al., 2002) e Rondônia (TgCkBr131-134) (DUBEY et al., 2007b) e isolados de gatos no estado de São Paulo (TgCatBr58-60;73-74) (PENA, 2008).

Outro isolado encontrado neste estudo cujo genótipo foi idêntico a genótipo já descrito para outros isolados foi o isolado TgCkBr196 (genótipo #32). O isolado TgCkBr196 encontrado no município de Aquidauana foi idêntico ao dos isolados TgCkBr111 e 112 encontrados por Dubey et al. (2007a) no estado do Pará e o isolado TgCkBr182 descrito por de Oliveira et al. (2008) encontrado no estado do Ceará.

A mortalidade dos camundongos em relação ao desafio com isolados com dois padrões para o marcador CS3 (alelos II e III) foi comparada. Para isolados com o alelo II a mortalidade foi de 100% enquanto não houve mortalidade de camundongos infectados com isolados contendo o alelo III de CS3.

No trabalho de Pena et al. (2008) camundongos infectados com isolados de *T. gondii* de gatos que demonstraram alelo III no *locus* CS3 tiveram uma alta sobrevivência comparado aos alelos I e II gerados pela digestão do mesmo *locus*. No presente estudo foi demonstrada a presença apenas dos alelos II e III no referido *locus*, sendo que os dois isolados (um dos novos genótipos encontrados mais o genótipo misto) que demonstraram o alelo II no *locus* CS3, foram ambos, patogênicos para os camundongos.

Apesar de encontrado os alelos tipo II em genótipo não virulento, o número de genótipos encontrados não foi suficiente para análises estatísticas quanto à diferença na patogenicidade para os camundongos entre os isolados que demonstraram alelos distintos no *locus* CS3. Ainda assim, nossos achados corroboram com os encontrados por Pena et al. (2008) também pela patogenicidade para os camundongos nos isolados que demonstraram alelos mistos na maioria dos *loci*.

Tabela 15 Genótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de galinhas dos municípios de Aquidauana e Rio Verde do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, através da análise de polimorfismo de DNA pela PCR-RFLP.

							Marcadores genéticos											
Genótipo		<i>T. gondii</i> isolado	Galinha	Prop	Pat. Cam.	OPI	5'+3'		SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3
Tipos clonais							SAG1	SAG2										
#59	1	TgCkBr188	11	1	não	não	u-1	I	II	I	III	II	u-1	III	III	III	I	II
	2	TgCkBr189	48	7	não	não	u-1	I	II	I	III	II	u-1	III	III	III	I	II
	3	TgCkBr190	3	5	não	não	u-1	I	II	I	III	II	u-1	III	III	III	I	II
	4	TgCkBr191	25	5	não	não	u-1	I	II	I	III	II	u-1	III	III	III	I	II
	5	TgCkBr192	7	7	não	não	u-1	I	II	I	III	II	u-1	III	III	III	I	II
	6	TgCkBr193	42	1	não	não	u-1	I	II	I	III	II	u-1	III	III	III	I	II
#30 (BrIII)	7	TgCkBr194	43	4	não	não	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III
	8	TgCkBr195	31	4	não	não	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III
#32	9	TgCkBr196	1	6	não	não	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	III
#60	10	TgCkBr197	24	7	sim	15-17 dpi	u-1	I	II	III	III	II	u-1	III	I	III	I	II
Misto	11	TgCkBr198	29	2	sim	18-24 dpi	I+u-1	I+III	II+III	III	III	II+III	III+u-1	I+III	I+III	III	I+III	II

Prop. – Propriedade

Pat. Cam. – Patogênico para camundongo (morte aguda)

OPI – Óbito pós-inoculação (referente à morte aguda)

A rede filogenética apresentada na figura 6 tem uma topologia similar a de outras já reconstruídas com amostras de *T. gondii* (DUBEY et al., 2008). A rede apresentada neste trabalho inclui os genótipos novos detectados no Estado do Mato Grosso do Sul (genótipos #59 e #60) e exclui o genótipo #51 (DUBEY et al., 2008) porque este genótipo contém caracteres não determinados. Somente amostras de galinhas e amostras de referências foram incluídas nesta análise (ver apêndice C).

Pela topologia da rede percebe-se a reconstrução de pelo menos seis grupos de genótipos, que na figura 6 são representados como populações numeradas de 1 a 6. As seis populações contêm indivíduos que foram isolados e ou detectados de animais de diversas regiões do país, não tendo sido possível associar o padrão genotípico com a proveniência da amostra. As populações foram definidas por inspeção visual da rede sendo separadas observando-se a existência de um ancestral comum único para cada população.

A análise de desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* conjuntamente com as análises de variabilidade intra e interpopulações demonstra que a população estudada apresenta estruturação, ou seja, pode ser subdividida em subpopulações.

Foram registrados valores elevados para os índices de fixação (F_{st}) entre todas as populações (todos os valores de p para os índices F_{st} interpopulações foram $< 0,05$) (Tabela 16). Ainda, o número de migrantes (M) estimado para cada par de população foram menores que 1 em todas as análises (Tabela 19). Com efeito, estes índices podem ser explicados pela diferença entre as variabilidades (médias das diferenças par a par) intra e interpopulações, valores apresentados na Tabela 18.

Considerando-se a população total, os testes de desequilíbrio de ligação para cada par de *loci* demonstraram desequilíbrio significativo para a maioria dos pares, indicando uma estruturação clonal da população analisada (Tabela 17).

Figura 6 – Rede filogenética de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas do Brasil. Os táxons representados pelo caractere “#” seguido de dois algarismos correspondem aos genótipos listados no Apêndice C. Sob as identificações das populações encontram-se as siglas dos Estados brasileiros em que integrantes desta população foram encontrados.

Tabela 16 - Valores dos Índices de Fixação F_{st} para análises interpopulacionais, par a par.

	1	2	3	4	5	6
1	0.00000					
2	0.55260	0.00000				
3	0.70515	0.59747	0.00000			
4	0.64378	0.48713	0.48570	0.00000		
5	0.59308	0.53798	0.71742	0.56430	0.00000	
6	0.36449	0.44468	0.66042	0.51927	0.40958	0.00000

Método de distância: Diferença par a par.

1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam as populações de 1 a 6.

Índice de fixação F_{st} indica a probabilidade de que dois alelos tomados aleatoriamente de uma subpopulação sejam iguais. É uma medida indireta de variabilidade, podendo ser calculado por:

$F_{st} = (f_0 - f_1) / (1 - f_1)$, (Slatkin, 1991), onde:

f_0 é a probabilidade de identidade entre dois alelos tomados aleatoriamente de uma mesma população e f_1 é a probabilidade de identidade entre dois alelos tomados aleatoriamente de populações distintas.

Os índices F_{st} foram testados estatisticamente sendo todos os valores de p resultando menores que 0,05.

Tabela 17 - Significância dos testes de desequilíbrio de ligação para os pares de *loci* polimórficos (nível de significância = 0,05).

	(continua)										
<i>Locus</i> #	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	*	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
1	+	*	+	+	+		+	+	+	+	+
2	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	*	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	*	+	+	-	-	+	-
5	+	-	+	+	+	*	+	-	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+
7	+	+	+	+	-	-	+	*	+	-	+

Tabela 17 - Significância dos testes de desequilíbrio de ligação para os pares de *loci* polimórficos (nível de significância = 0,05).

<i>Locus</i> #	(conclusão)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8	+	+	+	+	-	+	+	+	*	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	*	-
10	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	*

Locus numerados de 0 a 10 para SAG1, SAG2, SAG2new, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico, respectivamente.

+ : significância estatística

- : não significância estatística

Tabela 18 - Valores das médias das diferenças par a par entre as populações

	1	2	3	4	5	6
1	4.99700	15.39472	17.58188	18.09857	11.63320	10.38951
2	8.58725	8.61794	17.68947	17.02189	15.95349	15.66347
3	12.39176	10.68887	5.38324	13.26644	17.89916	19.70588
4	11.14419	8.25704	6.11893	8.91176	16.47899	18.44637
5	7.13471	9.64452	13.20754	10.02311	4.00000	11.83193
6	3.47924	6.94274	12.60250	9.57872	5.42017	8.82353

Método de distância: Diferença par a par.

Diagonal superior: Valores das médias das diferenças par a par entre as populações ($PiXY$)

Elementos na diagonal: Valores das médias das diferenças par a par dentro das populações (PiX)

Diagonal inferior: Valores das diferenças par a par corrigidas ($PiXY - (PiX + PiY)/2$)

Tabela 19 - Número de migrantes por geração (M).

Matriz de Valores M (M=Nm para dados haplóides, M=2Nm para dados diplóides)						
	1	2	3	4	5	6
1	*					
2	0.40481	*				
3	0.20907	0.33687	*			
4	0.27667	0.52642	0.52945	*		
5	0.34305	0.42940	0.19694	0.38605	*	
6	0.87178	0.62439	0.25709	0.46288	0.72078	*

M é o número absoluto de migrantes trocados entre cada par de populações por geração.

M pode ser calculado como:

$$F_{st} = 1/(2M+1)$$

6 DISCUSSÃO

As galinhas foram escolhidas de acordo com o fluxo do trabalho, ou seja, como a região pantaneira é muito grande e suas estradas não mapeadas, não foi possível traçar antecipadamente o planejamento das visitas às propriedades. Desta forma, inicialmente foi planejado coletar amostras de cérebros e corações de 50 animais, todavia a distância e dificuldade de acesso às propriedades e a necessidade de encaminhamento das amostras o mais rápido possível ao laboratório, possibilitou-nos estudar apenas 40 animais. Devido a este fato, não houve como calcular estatisticamente o número de amostras, sexo, idade e origem das mesmas (município) para a realização deste estudo.

A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* encontrada nas galinhas foi de 67,5% considerando-se como ponto de corte a diluição 1:5. Vários trabalhos anteriormente publicados revelaram prevalências semelhantes. A maior frequência de galinhas de criação livre soropositivas pelo Teste de Aglutinação Modificado, considerando a diluição 1:5 como ponto de corte, foi encontrada em Illinois (100%), seguindo-se da Nicarágua (85,7%) (DUBEY et al., 2007c,d). No Brasil as frequências de galinhas soropositivas para *T. gondii* pelo MAT (1:5) variaram entre 39% (São Paulo) a 100% (Alagoas) (DUBEY et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2009).

Os animais do presente estudo permaneciam durante o dia em áreas úmidas e sombreadas, ambiente este comum de ser encontrado na região pantaneira. Esta condição pode favorecer a infecção por *T. gondii* (AZEVEDO et al., 1983).

Os resultados deste estudo demonstraram alta frequência de animais positivos para *T. gondii* pelo MAT, corroborando com outros achados em pesquisas realizadas no Brasil (DUBEY et al., 2006d, 2007a; de OLIVEIRA et al., 2009). Estudos sorológicos e outros métodos de diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* em galinhas tem sido amplamente realizados e publicados devido ao importante papel epidemiológico que estes animais podem representar pela sua proximidade com o homem e seus animais domésticos e possível fonte de infecção aos humanos.

Vários autores retratam a pouca importância das criações de frangos em escala industrial na transmissão toxoplásmica para humanos, devido ao tipo de manejo intensivo e,

portanto, sem contato com felinos e outras fontes e infecção, além de ser um sistema rápido de produção (em média 40 dias de engorda). Porém, na criação doméstica em pequena escala, chamada tipo colonial ou caipira onde os animais estão sujeitos ao contato com felídeos, solo e água contaminados convivendo durante anos nesse mesmo ambiente, a possibilidade de transmissão aos seres humanos torna-se importante.

Há mais de dez anos Literak e Hejlícek (1993) já chamavam a atenção para o fato de que galinhas oriundas de pequenas criações poderiam conter cistos teciduais de *T. gondii*, representando risco de infecção para o homem, principalmente quando estes manipulavam carnes sem muita higiene ou por meio do consumo de carnes cruas ou mal cozidas. Dois anos depois pesquisadores observaram que a proporção de indivíduos que tinham contato com galinhas criadas em fundo de quintal era estatisticamente maior no grupo com sorologia reativa do que no grupo com sorologia não reativa. Com isso, sugeriram uma relação entre o contato com galinhas domésticas e o aumento da oportunidade de adquirir a infecção por meio do consumo da carne e/ou de ovos infectados (CAMARGO et al., 1995).

Além do sangue e do leite, a presença de taquizoítos de *T. gondii* tem sido descrita em outros fluidos como saliva, escarro, urina, lágrimas e sêmen (DUBEY; BEATTIE, 1988; REMINGTON; DESMONTS et al., 1990; EVANS, 1992). Na década de 60 alguns pesquisadores tentaram isolar *T. gondii* através de bioensaio em camundongos utilizando ovos, ovários, ovidutos, cérebros, corações e musculatura esquelética de galinhas naturalmente infectadas. Estes autores conseguiram isolar o parasita dos ovidutos, ovários, cérebros e corações, porém não dos ovos, o que os levou a concluir que não há qualquer evidência da possibilidade de transmissão horizontal de *T. gondii* ao homem, através do consumo de ovos de galinhas naturalmente infectadas (JACOBS; MELTON, 1966). Dubey et al. (2005d) também afirmam que apesar de possível a infecção pelo *T. gondii* em ovários e ovidutos de galinhas, os ovos não devem ser consideradas como uma fonte de infecção para humanos.

Conforme descrito e demonstrado na seção material e métodos deste trabalho, o Pantanal Brasileiro apresenta onze subdivisões, cobrindo parte dos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, assim denominadas: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paiaguás, Nhecolândia, Aquidauana, Abobral, Miranda, Nabileque, Paraguay e Porto Murtinho (SILVA; ABDON, 1998).

Estudo recente em aproximadamente 32.500 gestantes relata prevalência de apenas 0,42% de toxoplasmose no estado do Mato Grosso do Sul (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005). Estudos de soroprevalência da doença nos animais do estado mostraram maiores prevalências. Em 1983 foi realizado o primeiro estudo soroepidemiológico para toxoplasmose em equinos do estado. Dos 750 avaliados, 32,8% dos animais foram soropositivos no Teste de Imunofluorescência, entretanto, os autores não detalharam a localização dos animais amostrados neste experimento (LARANJEIRA, et al., 1985). Próximo a sub-região da Nhecolândia, na sub-região de Miranda, foi realizado estudo soroepidemiológico em 41 veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) sendo encontrados 12% de positividade pelas técnicas de Imunofluorescência Indireta, Hemaglutinação Indireta, Elisa e Dot-Elisa em diferentes diluições (FERREIRA et al., 1997).

Estudo realizado em 1970 também na região pantaneira (porém no pantanal matogrossense) relata positividade de 25 e 77,8% em cães e veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*), respectivamente, pelo teste de Sabin-Feldman para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (BARUZZI et al., 1970). Mais recentemente, Silva (2005) avaliou 150 equinos de 15 propriedade rurais de 7 sub-regiões do pantanal sul-matogrossense (incluindo a sub-região da Nhecolândia) e demonstrou apenas 1,33% de animais positivos pelo Teste de Hemaglutinação, porém, nenhum dos animais positivos era da sub-região da Nhecolândia.

Provavelmente devido ao difícil acesso às sub-regiões pantaneiras sujeitas a inundações, como é o caso da sub-região cujos animais avaliamos neste estudo, as publicações sejam raras. Infelizmente isto prejudica a observação e comparação das variações nos valores de ocorrência da toxoplasmose na região estudada.

Além de fatores como manejo e higiene, a densidade de gatos e as condições do ambiente interferem na aquisição de oocistos pelos animais (TENTER et al., 2000). Associação positiva foi observada entre a prevalência de infecção toxoplásmica e a presença de gatos em uma caprinocultura, indicando que a presença de gatos e o estreito contato com esta espécie é importante na epidemiologia da doença (NETO et al., 2008). Os felídeos têm um papel importante na transmissão toxoplásmica para os humanos e outros animais porque são os únicos hospedeiros que podem excretar oocistos no ambiente (DUBEY; BEATTIE, 1988).

A escolha do sexo dos animais foi atribuída pelos proprietários/funcionários das propriedades. Apesar de não significativo ($p = 0,091$), a soroprevalência para *T. gondii* pelo MAT foi maior nas fêmeas (78,5%) do que nos machos (52,9%). A não significância entre a soropositividade para *T. gondii* em machos e fêmeas corrobora com outros estudos realizados com animais domésticos e silvestres (DUBEY, 1987,1990; DUBEY; BEATTIE, 1988; DORNY; VAN AKEN, 1992; STASHISSINI, 2005; PENA 2004; RAGOZO, 2007; YAI , 2007).

Todos os animais estavam em perfeito estado físico, exceto os animais 41 e 1 (fêmeas), ambos da propriedade 6 (Rancho Grande) que estavam prostrados e em decúbito esternal há 1 dia. A galinha 41 foi negativa para *T. gondii* e a galinha 1 foi positiva (título 640). Ambas apresentavam histórico de diarreia dias antes do decúbito. Da galinha 1 foi obtido isolamento de *T. gondii*, cujo genótipo foi o BrIII (dados discutidos mais adiante).

Alguns estudos anteriormente publicados sobre infecção experimental de *T. gondii* em galinhas não relataram a presença de sinais clínicos semelhantes aos observados nestes animais (BIANCIFIORE, et al., 1986; DUBEY et al., 1993; KANETO et al., 1997; GALLI et al., 2008). Porém, Meireles et al. (1995) inocularam frangos de corte com 50.000 oocistos de *T. gondii* por via oral e observaram a presença de diarreia com fezes esverdeadas 6 dias após as inoculações com duração de 6 a 7 dias. Além da diarreia os animais apresentaram apatia e dificuldade respiratória e vieram a óbito após aproximadamente 12 dias da inoculação. Alta mortalidade e a presença também de diarreia, porém esbranquiçada, também foram relatados por Nóbrega et al. (1955).

Além da genotipagem utilizando os isolados obtidos pelo bioensaio nos camundongos, foi feita a detecção do *T. gondii* nas amostras das galinhas (amostras primárias) através do PCR diretamente, obtendo-se uma boa amplificação, porém, não realizamos a genotipagem das amostras primárias positivas.

Para as análises das amostras primárias foi utilizada a técnica de PCR empregando genes repetidos (gene B1, sequência TGR1E). A PCR inicialmente foi adaptada para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, utilizando genes únicos (P30) ou repetidos (B1) além de genes ribossomais codificadores de 18S rRNA (CHABBERT et al., 2004). Alguns autores citam que os oligonucleotídeos utilizados em reações de PCR que mais eficazmente detectam

o DNA do *T.gondii*, após análises comparativas de PCR “In-House” (caseiro), são os *primers* para o gene B1 (HOHLFELD et al., 1994; PELLOUX et al., 1996; JONES et al., 2003).

Através do PCR das amostras primárias (galinhas) revelou-se que 59,26% das galinhas soropositivas no MAT foram positivas na PCR. A avaliação foi feita considerando-se como ponto de corte para MAT a diluição 1:5. Esta percentagem correspondeu a 16 galinhas, das quais 5 delas (31,3%) não foram obtidos isolamentos nos camundongos. A concordância razoável ($kappa = 0,486$) entre os testes (MAT e PCR) nas galinhas pode ser explicada por diversos fatores como reações cruzadas no MAT, amplificação de DNA de *T. gondii* não viável nos tecidos das galinhas pela PCR, localização diferenciada do parasita nas galinhas como em musculatura esquelética do peito, coxa ou outros órgãos que não foram utilizados no bioensaio ou ainda baixa sensibilidade na PCR.

Sabe-se que uma das limitações da técnica do PCR é que a positividade não discrimina se o material amplificado provém de parasitas viáveis ou de fragmentos do parasita (HOLLIMAN, 1994). Além disso, existe uma possibilidade de resultado falso-negativo pelo fato de nas alíquotas utilizadas não estar presente material do parasita, não sendo neste caso, possível a amplificação do material genético do mesmo pelo PCR. Por este motivo, extraímos o DNA em triplicata para aumentar a sensibilidade da técnica. Das 16 amostras positivas das galinhas na PCR, 25% delas foram obtidas nas alíquotas extras (terceira amostra), demonstrando que esta falha no Teste pode ser amenizada pela repetição nas extrações.

A técnica de PCR tem sido utilizada para detectar infecção toxoplásmica por ser considerada uma técnica sensível, altamente específica e rápida (JOSEH et al., 2002; YAI et al., 2003), porém como não discrimina a viabilidade do parasita presente nos tecidos analisados, não tem capacidade de detectar a doença ativa (ASPINAL et al. 2002), esteja ela na forma aguda (parasitemia) ou crônica (cistos viáveis teciduais).

O diagnóstico molecular pelo PCR pode ser considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de infecção no útero em humanos (PETERSEN, 2007), entretanto alguns autores citam que a sensibilidade é muito dependente da fase gestacional e também pode variar com o gene-alvo (MONTROYA et al., 2002). Filisetti et al. (2003), testaram os *primers* para os genes únicos, P30, e genes repetidos, B1 e constataram que não havia uma diferença significativa em termos de sensibilidade e especificidade que definisse qual *primer* seria o ideal dentre os testados. Estes autores trabalharam com diagnóstico da toxoplasmose congênita em amostras

de líquido amniótico e amostras biológicas humanas (HO-YEN et al., 1992; FRICKER-HIDALGO et al., 1998; REMINGTON et al., 2004).

Apesar de oneroso e laborioso (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999), alguns pesquisadores afirmam que para a detecção de *T. gondii* em tecidos o teste padrão é o bioensaio em camundongos (HOMAN et al., 2000). Garcia et al. (2006) realizaram infecção experimental em suínos para avaliar os diferentes métodos na detecção desta infecção e encontraram 64,6% de positividade pela inoculação em cobaias (bioensaio) e apenas 16,6% pelo PCR.

Neste estudo consideraram-se positivos no MAT (galinhas) os soros dos animais que apresentavam aglutinação a partir da diluição 1:5. Considerando a técnica de PCR como “padrão ouro” e analisando a sensibilidade e especificidade diagnósticas da MAT, concluímos que a sensibilidade do diagnóstico, por MAT (ponto de corte 1:5), da infecção por *T. gondii* em galinhas foi de 100% e a especificidade de apenas 54,2%, porém, quando consideramos um ponto de corte superior (1:40), a especificidade subiu para 100%. Isso poderia estar ocorrendo devido à presença de impulsos elementares inespecíficos (reação cruzada), ou seja, os anticorpos dos soros (diluição 1:5, 1:10 e 1:20) dos animais que reagiram com antígenos de *T. gondii* no MAT são específicos para outro microorganismo que não *T. gondii*. Esta hipótese é reforçada quando analisamos a concordância estatística entre os valores de animais soropositivos no MAT utilizando como ponto de corte a diluição 1:40 e os animais positivos na PCR, revelando uma concordância excelente entre estes diagnósticos ($Kappa = 0,947$, $p < 0,0001$).

Neste trabalho, 12 (44,5%) das 27 galinhas, que apresentaram títulos de anticorpos anti- *T. gondii* entre 5 e 20 não geraram isolamentos positivos nos camundongos (apêndice A). Estas reações de aglutinação observadas no MAT poderiam ser explicadas, como descrito anteriormente, por reatividade cruzada com outros microorganismos ou uma “cicatriz imunológica” deixada pelo parasita que não está mais no hospedeiro. Há evidências que as chances de isolamento aumentam de acordo com o aumento dos títulos de anticorpos, porém Dubey et al. (2002, 2003a,c, 2005a,b, 2006c, 2007a) e Sreekumar et al. (2003), conseguiram isolar *T. gondii* de galinhas com títulos baixos (5) ou soronegativas através de bioensaio em camundongos ou em gatos.

Sreekumar et al (2003), durante os primeiros estudos sobre genotipagem de *T. gondii* em galinhas, realizado na Índia, analisaram os soros de galinhas por MAT levando em consideração um ponto de corte a diluição 1:5 e isolaram *T. gondii* de fezes de gatos alimentados com tecidos de cinco frangos com títulos 1:5 ou menor. Estes autores ainda afirmaram que a ausência de isolamento de *T. gondii* a partir de galinhas soronegativas sugere que a incidência de resultados falsos negativos no MAT é baixa.

Já dos tecidos das galinhas número 38 e 19, cujos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* foi respectivamente 2.560 e 5.120, apesar de positivos na PCR, a infecção não se reproduziu nos camundongos. Sreekumar et al (2003) também não conseguiram isolar *T. gondii* de tecidos de algumas galinhas com título 1:80 e justificaram que o armazenamento inadequado, como falta de refrigeração suficiente durante o transporte, tenha afetado a viabilidade do parasita.

Neste experimento mantivemos as amostras bem conservadas durante os 3 dias de permanência no pantanal e durante o transporte, sendo as mesmas conservadas em caixas de isopor com gelo, já que na região a energia elétrica de algumas propriedades é originada de geradores próprios movidos a óleo diesel. Porém, as quatro galinhas (28, 27, 38 e 19) que tiveram altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* no MAT (320, 320, 2.560 e 5.120 respectivamente) foram eutanasiadas no primeiro dia e na manhã do segundo dia. Não há como garantir que o tempo que levamos desde a eutanásia e coleta das amostras até o laboratório, tenha inviabilizado o parasita e gerado tais resultados, apesar de que os tecidos (cabeças e corações) chegaram ao laboratório aparentemente bem conservados e sem características de deterioração.

Esta ausência de isolamento do *T. gondii* nas galinhas com altos títulos de anticorpos pode ter ocorrido também ou porque a infecção toxoplásmica na galinha encontrava-se na fase aguda e portanto ainda não havia se disseminado completamente atingindo coração e cérebro ou porque havia ainda poucos cistos nestes órgãos não permitindo o isolamento do *T. gondii* em nenhum dos nove camundongos. Estas duas hipóteses seriam viáveis já que exames sorológicos dos camundongos de ambos os grupos (G12, inoculados com a galinha 38 e G13, inoculados com a galinha 19) foram negativos no MAT.

Outra possibilidade é que títulos elevados de IgG ocorrem mais tardiamente depois do contato com o agente infeccioso e podem permanecer positivos por anos após a cura

(VIRELLA, 2007). Desta forma, a presença de cistos inviáveis nos tecidos das galinhas explicaria a positividade na PCR para *T. gondii* no tecido das mesmas. Uma última possibilidade seria a de que havia sim cistos viáveis em tecidos das galinhas positivas, porém não foram os tecidos utilizados no bioensaio. Dubey et al. (2007c) ressaltam a importância de se incluir nos estudos, além do cérebro e coração, músculos peitorais e da coxa das galinhas, para aumentar as chances de isolamento.

Sensibilidade e especificidade diagnósticas da MAT nas amostras de soro dos camundongos foram semelhantes aos testes de sensibilidade e especificidade da MAT nos soros das galinhas, quando consideramos infectados os camundongos com detecção positiva pela PCR ou na observação de cistos de bradizoítos, sendo obtidos 87,5% de sensibilidade e 94,8% de especificidade (dados não demonstrados). Análises de sensibilidade e especificidade da MAT nas galinhas baseando-se nos resultados dos bioensaios (isolamentos) não foram possíveis devido ao fato de não termos utilizado tecido de galinhas soronegativas para o bioensaio.

Agentes infecciosos podem compartilhar determinantes antigênicos similares, podendo acarretar reações cruzadas que dificultam a interpretação de testes imunodiagnósticos. Entretanto, o teste apresentará sempre títulos mais elevados na presença de anticorpos específicos para o antígeno, que para anticorpos decorrentes de reatividade cruzada. Por este motivo há a necessidade de se estabelecer os pontos-de-corte (“*cut-off*”) para cada técnica (ROSE et al., 1997).

No caso da toxoplasmose em galinhas, isto poderia ser feito a partir de um número suficientemente grande de amostras de soro de um grupo de indivíduos que sabidamente não tiveram contato com o agente infeccioso que se quer diagnosticar como por exemplo, galinhas poedeiras que vivem em sistema intensivo.

Toxoplasmose experimental em galinhas foi avaliada por diversos pesquisadores e a titulação de anticorpos foi mensurada por técnicas sorológicas variadas. Entretanto, apesar de encontrarmos diferenças entre os experimentos realizados, é difícil comparar resultados visto que, a infecção toxoplásmica por estágios diferentes do parasita, gera diferentes respostas, normalmente mais intensas quando se utilizam oocistos do mesmo (GALLI et al., 2008).

Galli et al. (2008) realizaram infecção experimental de frangos domésticos para verificar as diferenças de padrões clínicos e comportamento de aglutininas séricas em animais

inoculados com cepas diferentes de *T. gondii*. Verificou-se pico de produção de anticorpos 35 dias depois da infecção sendo a partir daí, observada uma diminuição progressiva dos títulos, apesar de que, durante os 63 dias de duração do experimento, anticorpos ainda foram detectados (Método de Aglutinação Direta, por SILVA et al., 2002). Estes pesquisadores infectaram os animais com concentrações variadas de oocistos de *T. gondii* de duas cepas distintas, por via oral.

Antes destes pesquisadores, dois outros trabalhos foram publicados sobre infecção experimental em frangos utilizando oocistos como formas infectantes e ambos relataram a permanência de altos títulos de anticorpos nas galinhas após 40 a 68 dias da inoculação, detectados pelos métodos de Aglutinação Modificado e ELISA (DUBEY et al., 1993) e ELISA (BIANCIFIORI et al., 1986).

Infecção experimental em frangos e a mensuração dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* por vários meses ainda não foi realizada. Os estudos relacionados à infecção experimental por diferentes cepas foi realizado (DUBEY et al., 1993; GALLI et al., 2008), porém a mensuração dos níveis de anticorpos foi realizada em período curto (aproximadamente 2,5 meses). Um estudo mais duradouro poderia revelar o comportamento da resposta imune humoral em frangos infectados pelo *T. gondii* sugerindo se, nestes animais, as infecções aguda e crônica estão relacionadas a altos ou baixos títulos de anticorpos ou se a produção é intrínseca a cada animal, ou seja, dependendo da resistência individual de cada uma.

Sabe-se que o sucesso do isolamento depende do número de camundongos inoculados, quantidade de tecido utilizado no bioensaio e a concentração de parasitas nas amostras de tecidos utilizados (DUBEY et al., 2006a).

Análises de virulência e/ou genotipagem de isolados de *T. gondii* realizados através de bioensaio em camundongos e gatos estão sendo realizados pelo mundo há mais de uma década (HOWE; SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997; MONDRAGON et al., 1998; OWEN; TREES, 1999; COLE et al., 2000; FUENTES et al., 2001; GRIGG et al., 2001; ASPINALL et al., 2003; DUBEY et al. 2003a, 2005a, 2006a, 2007c) e continuam a ser publicadas até hoje (BASSO et al., 2009; CARME et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; ZHOU et al., 2009; YAI et al., 2009), entretanto análises moleculares das amostras primárias (galinhas, gatos, capivaras, patos, etc.) são geralmente pouco realizadas nestes estudos.

Pena (2004) relatou presença de genótipos de *T. gondii* isolados de gatos (amostras primárias) correspondentes aos genótipos identificados nos isolados em camundongos, entretanto em 19% das amostras primárias dos gatos, cujos isolamentos foram obtidos em camundongos, não foram obtidos amplificação do DNA de *T. gondii* pelo PCR.

Ragozo (2007) realizou *nested*PCR em 21 amostras de ovinos soropositivos, com títulos acima de 200, porém sem isolamento em camundongos, e não ocorreu a amplificação de nenhuma das amostras primárias. Este autor relata que o insucesso das amplificações pelo *nested*PCR para *T. gondii* nestas amostras primárias de ovinos fossem provavelmente devido a pouca quantidade do parasito nesses tecidos.

Yai (2007) realizou PCR seguida de *nested*PCR das amostras primárias (capivaras) encontrando identidade entre os genótipos encontrados nos isolados em camundongos e suas respectivas amostras primárias, exceto por 1 amostra, cujos achados foram distintos.

Aigner (2008) em análise molecular de *T. gondii* diretamente em tecidos de galinhas infectadas naturalmente no estado do Paraná, relatou a presença de duas galinhas negativas na PCR em tempo real cujo título de anticorpos anti-*T. gondii* detectados no Teste de Aglutinação Direta (MAD) foi 800. Além disso, este autor declara que as causas desta ausência de amplificação do DNA pode ter ocorrido pelo fato dos cistos não estarem localizados nos tecidos avaliados ou ainda pela possibilidade de degradação do DNA durante a processo de digestão.

Dos 141 camundongos, seis vieram a óbito após 30 minutos no mínimo e 24 horas no máximo depois das inoculações. Estas mortes podem ter ocorrido devido ao estresse no momento da contenção dos animais. Dois camundongos que adoeceram aproximadamente 12 horas depois das inoculações, pertenciam ao mesmo grupo experimental, G11, cujos animais morreram de toxoplasmose aguda 15 a 17 dias após a realização do bioensaio. Um deles apresentou paresia de todos os membros vindo a óbito logo após o surgimento destes sinais clínicos (aproximadamente 12-18 horas). O outro manifestou paresia dos membros anteriores e apatia e antes do óbito (que ocorreu em 24 horas após a inoculação) apresentou extrema letargia e paresia de todos os membros. Por este motivo, sugere-se que, sem exceção, todos os animais que vierem a óbito, não imediatamente após as inoculações, tenham seus órgãos e fluidos biológicos examinados em busca de taquizoítos de *T. gondii* pela possibilidade de

ocorrência de hiper-infecção. Na genotipagem do isolado obtido deste grupo, um genótipo nunca antes identificado, foi encontrado.

Em relação ao isolamento de *T. gondii* nos camundongos inoculados, consideramos isolamento positivo quando observado cistos de bradizoítos no cérebro dos camundongos eutanasiados, taquizoítos no líquido peritoneal e/ou pulmão dos camundongos que vieram a óbito por infecção aguda e aparecimento de bandas eletroforéticas após amplificação de sequência gênicas específicas do parasita por PCR.

Altos títulos de anticorpos nas galinhas foram associados com um maior número de camundongos com cistos de bradizoítos nos cérebros ($p < 0,0001$). A correlação moderada ($r = 0,302$) entre estes dois parâmetros indica que apesar de termos encontrado um maior número de camundongos com cistos entre os camundongos inoculados com tecidos de galinhas cuja titulação de anticorpos anti-*T. gondii* foi média ou alta, esta relação não foi diretamente proporcional. Neste trabalho, observamos um maior número de cistos provenientes mais de galinhas com médios títulos (640, 1.280) do que com altos títulos de anticorpos (5.120 e 10.240).

Praticamente os mesmos resultados foram os encontrados para a correlação com os resultados fornecidos pela PCR. Um maior número de positivos (número de camundongos de um mesmo grupo positivos na PCR entre o total inoculado) ocorreu nos camundongos que foram inoculados com tecidos de galinhas que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, sendo estes 640, 1.280, 10.240 e 5.120. Entretanto, neste caso, ao analisarmos a correlação entre as percentagens de camundongos positivos (pela PCR) e os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas, observou-se uma correlação positiva substancial ($r = 0,546$) entre eles. Como esperado, não houve diferença estatística entre as correlações encontradas entre os títulos das galinhas e os isolamentos obtidos por achados de cistos nos camundongos infectados ou detectados através do PCR ($p = 0,087$).

Ragozo (2007) também encontrou relação entre frequência de isolamentos em camundongos e altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* em ovinos. Foram obtidos isolamentos em 69,2% dos camundongos inoculados com tecidos de ovinos de título 3.200. Já Yai (2007) não encontrou diferença entre os títulos de anticorpos de capivaras e o percentual de isolados obtidos em camundongos bioensaiados. Pena (2004) também encontrou maior

freqüência de isolamentos nos grupos de camundongos inoculados com tecidos de gatos com altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*.

Todas as análises moleculares realizadas nos camundongos foram feitas a partir dos cérebros dos mesmos. Entretanto, a PCR também foi realizada a partir de fragmentos de musculatura esquelética da perna e coração de camundongos inoculados com tecidos de galinhas positivas para *T. gondii* na PCR e no MAT (título ≥ 20), porém sem isolamento em nenhum dos camundongos do grupo (G4, G15, G12, G13 e G17). Em nenhuma destas amostras foi obtido isolamento de *T. gondii*.

Sabe-se que os cistos tissulares crescem e permanecem intracelulares, contendo poucos a várias centenas de bradizoítos e sendo mais prevalentes nos tecidos muscular e neural, incluindo cérebro, olhos, músculos cardíacos e também esqueléticos (DUBEY et al., 1998; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Dubey et al. (2004a) em estudo da infecção por *T. gondii* em gatos do Paraná, mostraram que o parasita é mais freqüente nos tecidos musculares (músculos esqueléticos e coração) do que no cérebro. Pena (2004) também cita que se tivesse separado as amostras de cérebro das amostras de coração e musculatura esquelética em seu experimento com gatos, poderia ter obtido um maior número de isolamentos.

Neste trabalho, não tentamos isolar *T. gondii* das amostras de musculatura esquelética de todos os camundongos, inclusive dos camundongos que foram isolados o parasita de seus cérebros. Desta forma, não podemos afirmar se haveria ou não, maior facilidade de isolamento entre os diversos tipos de tecido. As amostras de tecido muscular analisadas neste estudo foram somente dos camundongos cujos isolados de *T. gondii* não foram obtidos de seus cérebros apesar de terem sido inoculados com tecidos de galinhas com altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*. Todos os camundongos destes grupos (G15, G4, G17, G12 e G13) foram negativos pelo MAT, o que podemos concluir que *T. gondii* não se reproduziu nos bioensaios porque, por algum motivo, não estavam viáveis nos tecidos das galinhas ou não estavam presentes nos órgãos utilizados no bioensaio.

Um camundongo do grupo G21 inoculado com tecidos da galinha 49 apresentou resultado positivo no MAT (1:25), porém a galinha 49 apresentou título de anticorpos anti-*T. gondii* no MAT 1:5 e o resultado da PCR do “pool” de cérebro e coração da mesma, foi negativo (Tabela 16, para melhor visualização). Resultado falso positivo pode ter ocorrido no MAT no soro deste camundongo, visto que, além de ser proveniente da galinha 49 (título

muito baixo para *T. gondii* e PCR negativo), nenhum dos outros camundongos do grupo foram positivos no MAT ou obtidos isolamentos. Além disso, conforme consideração anterior, a especificidade da MAT nos camundongos, não foi 100%. No entanto, a infecção de apenas uma pequena proporção de camundongos inoculados pode ser indicativa de que apenas alguns poucos bradizoítos estavam no inóculo, tendo sido liberado a partir de um único cisto tecidual (DUBEY et al., 2004a). Além disso, uma parte dos bradizoítos liberada dos cistos durante o processo de digestão e concentração da amostra pode ter sido destruída (DUBEY et al., 2002).

Neste trabalho os órgãos de todos os camundongos inoculados que não vieram a óbito por infecção aguda foram coletados para pesquisa de *T. gondii* em fragmentos cerebrais e por análise molecular (PCR), independentemente do resultado da sorologia.

Os resultados individuais de todos os camundongos estão demonstrados no apêndice B. Dos 32 camundongos positivos na PCR, 28 foram também positivos no MAT, revelando uma concordância ótima entre eles ($Kappa = 0,815$). Os quatro camundongos PCR positivos, ou seja, com isolamento de *T. gondii*, e MAT negativos, eram dos grupos G3, G5, G6 e G14. Além disso, nos camundongos dos grupos G3 e G14 foram encontrados cistos contendo bradizoítos em seus cérebros (apêndice B). O fato destes camundongos não serem positivos no MAT pode ter sido ou porque não soroconverteram ou devido à baixa sensibilidade diagnóstica que foi de 87,5%. A ausência de soropositividade nos camundongos infectados também pode ter ocorrido por um efeito pró-zona devido ao fato da técnica de aglutinação ser um teste de ligação secundária. Neste caso, nem todo impulso elementar, ou seja, a ligação do anticorpo com seu epítipo correspondente, participa da geração do sinal, de maneira que um aumento contínuo de impulsos elementares não leva necessariamente a um aumento contínuo do sinal (RICHTZENHAIN, 2005). Desta forma o excesso de anticorpos nos soros dos camundongos inoculados pode ter interferido na geração do sinal e, portanto, na observação de positividade. A ausência de soroconversão em camundongos bioensaiados e com isolamento positivo de *T. gondii* não foi citada em nenhum trabalho anteriormente realizado semelhante a este. Porém, Pena (2004) realizou várias diluições no soro de camundongos positivos no MAT para verificar a titulação máxima de anticorpos anti-*T. gondii* e verificou altos títulos de anticorpos neste animais, chegando a 409.600. Apesar de este autor ter realizado estudo com gatos e não com galinhas, isto sugere que camundongos produzem altíssimas quantidades de anticorpos o que poderia explicar a ocorrência do fenômeno pró-

zona no MAT. Pena (2004), Yai (2007) e Ragozzo (2007), não encontraram cistos nos cérebros de camundongos soronegativos, entretanto estes autores não realizaram análise molecular das amostras de tecidos destes camundongos.

Os cinco camundongos que foram negativos na PCR, porém positivos para *T. gondii* no MAT foram os G2^{dor}, G3^{cab}, G6^{dor}, G14^{dor} e G21^{pat-e}. Estes animais foram inoculados com galinhas de títulos de anticorpos anti-*T. gondii* 5.120, 1.280, 320, 1.280 e 5, respectivamente. Cistos de bradizoítos foram encontrados em 3 destes 6 camundongos. Em todos os tecidos das galinhas inoculados nestes animais foram obtidos amplificação do DNA do *T. gondii* exceto pela galinha inoculada no camundongo G21^{pat-e}. Apesar de altos títulos de anticorpos nas galinhas estarem associados a maiores quantidades do parasita nos tecidos das mesmas, principalmente no cérebro (AIGNER, 2008), provavelmente não foi obtido isolamento nos camundongos G2^{dor}, G3^{cab}, G6^{dor} e G14^{dor} por pouca quantidade de bradizoítos na alíquota da suspensão de tecidos da galinha utilizado. Mesmo que o DNA do parasita fosse extraído desta suspensão, o mesmo pode não ter sido capturado na amostra pipetada para a realização da técnica de PCR. Outra justificativa seria o fato do parasita encontrar-se em outro local que não o cérebro, já que não realizamos análise molecular do “pool” de musculatura esquelética destes animais (galinhas).

Já no soro do camundongo G21^{pat-e} pode ter ocorrido um resultado falso-positivo já que além não termos encontrado cistos em seu cérebro, não houve amplificação do DNA do parasita na PCR em nenhum outro camundongo do mesmo grupo. Além disso, o título de anticorpos anti-*T. gondii* da galinha cujo tecido foi inoculado neste camundongo foi baixo (5).

Neste estudo, *T. gondii* foi isolado de 40,7% das galinhas soropositivas e conforme discutido anteriormente, o número de isolamentos foi maior nas galinhas de títulos acima de 640. A frequência de isolamento do *T. gondii* provenientes de tecidos de galinhas soropositivas corrobora com outros estudos anteriormente publicados como no Egito (40,8%), Israel (42,2%), Estados Unidos (55%), Costa Rica (53,3%), Chile (46,8%) e no Brasil nos estados do Ceará (35,3%) e Bahia (40%) (DUBEY et al., 2003a,b, 2004b, 2006a,e, OLIVEIRA et al., 2009). A frequência de isolamentos de *T. gondii* através do bioensaio em camundongos provenientes de galinhas de criação livre no Brasil e no mundo mostra-se bastante diversificada, variando entre 14% (de OLIVEIRA et al., 2009) e 100% (DUBEY et al., 2007c).

No presente trabalho, foram estudados os isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas de criação livre de uma região do Mato Grosso do Sul imediatamente adjacente a área pantaneira. Trata-se da primeira pesquisa de aspectos moleculares de *T. gondii* isolados desta área. Através da análise do polimorfismo do DNA revelado pelos marcadores após digestão com as respectivas enzimas de restrição, cinco genótipos, incluindo um isolado de infecção mista, foram revelados nos 11 isolados de galinhas de cinco propriedades do município de Aquidauana e de uma propriedade do município de Rio Verde do Mato Grosso. Dois destes genótipos são descritos pela primeira vez.

Os dados moleculares revelam a grande diversidade genética de *T. gondii* em nosso meio, fato já demonstrado em outros estudos realizados com amostras brasileiras. Em pesquisas com animais de vida livre no Brasil, Dubey et al. (2008) revelaram a existência de 58 genótipos em 151 isolados de *T. gondii* de galinhas caipiras, o que significa uma diversidade genética de 38,4% (considerando diversidade genética = no. de genótipos encontrados/no. de isolados pesquisados). Estudos recentes, como os publicados por Yai et al., (2009), revelaram 16 genótipos entre os 36 isolados de *T. gondii* de capivaras demonstrando uma diversidade genética de 44,0%. Em felinos naturalmente infectados no estado de São Paulo, foram detectados 46 isolados e 20 genótipos (43,5%). Na pesquisa realizada neste estudo, foram amostradas galinhas de apenas dois municípios do território sul-matogrossense encontrando-se uma diversidade de 40%. Este índice de diversidade sugere que os diversos genótipos de *T. gondii* devem estar amplamente difundidos e circulando simultaneamente. Corrobora esta hipótese, o encontro freqüente de genótipos mistos, inclusive neste trabalho, e a presença de dois genótipos em uma mesma propriedade, como foi o caso dos genótipos #59 e #60, respectivamente obtidos dos isolados TgCkBr188-193 e TgCkBr197.

Apesar de no presente estudo ter sido avaliado um pequeno número de isolados, os mesmos apresentaram um repertório de alelos bastante diversificado, sendo a diversidade genética comparável aquela registrada em estudos com amostras mais numerosas, o que corrobora a afirmação de que a população de *T. gondii* do Brasil é altamente diversa e esta característica vem se verificando repetidamente em diferentes inquéritos epidemiológicos (DUBEY et al., 2007b).

O primeiro genótipo identificado (#59) foi obtido de seis isolados provenientes de três propriedades distintas (1, 5 e 7), sendo dois isolados por propriedade, todas do município de Aquidauana. A propriedade 1 estava a 8,7Km da propriedade 5 e a 19,5Km da propriedade 7. As propriedades 5 e 7 estavam a 11,9Km de distância uma da outra, considerando a menor distância entre elas (linha reta). Este genótipo (#59) foi identificado pela primeira vez, considerando estudos anteriores.

De acordo com Pena et al. (2008) camundongos infectados com isolados de *T. gondii* que demonstram alelo I ou II para o *locus* CS3 são virulentos para camundongos. Em experimento visando identificar a estrutura populacional de *T. gondii* e a virulência de genótipos brasileiros em camundongos, foram revelados 84 e 82% de mortalidade em camundongos infectados com isolados de *T. gondii* que demonstraram os alelos I e II respectivamente, para o marcador CS3 (PENA et al., 2008).

Resultados publicados por Yai et al. (2009) mostram que 91,1 e 85,5% dos isolados obtidos de tecidos de capivaras naturalmente infectadas que apresentaram, respectivamente, os alelos I e II para o *locus* CS3 causaram mortalidade em camundongos.

No presente estudo, o genótipo #59 identificado nos isolados TgCkBr188 – 193, apesar de mostrar o alelo II como produto de digestão do *locus* CS3, não foi letal para os camundongos. Pena et al (2008) afirmam que mais isolados que apresentam os alelos I ou II no *locus* CS3 devem ser testados em camundongos para se determinar sua virulência, pois a dose infectante para determinado isolado ainda não é conhecida no processo do isolamento do parasita e a virulência em camundongos só pode ser inferida quando múltiplos isolados de um mesmo genótipo são testados.

Todavia, corroborando com estudos sobre a virulência de isolados que demonstram os alelos I ou II no *locus* CS3 (PENA et al., 2008), o genótipo #60 e o genótipo misto encontrados neste estudo demonstraram o alelo II como produto da digestão para este *locus*, sendo ambos letais aos camundongos. O genótipo misto demonstrou alelos mistos na maioria dos *loci*. Pelos resultados é improvável a possibilidade de associação de padrão RFLP do *locus* CS3 e virulência em camundongo.

O segundo genótipo encontrado foi obtido de dois isolados (TgCkBr 194 e 195), ambos provenientes da mesma propriedade. Este genótipo, de acordo com classificação de Pena et al. (2008), é do tipo BrIII. Ele já foi anteriormente isolado de três galinhas no estado

de São Paulo (TgCkBr7, 11 e 17) (DUBEY et al. 2002), quatro galinhas do estado de Rondônia (TgCkBr131-134) (DUBEY et al. 2006c), cinco gatos no estado de São Paulo (TgCatBr58-60;73-74) (PENA et al. 2008) e atualmente de três capivaras dos municípios de Cordeirópolis e Ribeirão Preto, estado de São Paulo (TgCpBr11; 23-24) (YAI et al., 2009). O não encontro de outros genótipos clonais pode ser devido à pequena quantidade de isolados pesquisados. Também como comprovado em estudos anteriores, o genótipo BrIII foi avirulento para camundongos.

O terceiro genótipo (denominado #32) encontrado foi obtido do isolado TgCkBr196 e revelou o alelo III em praticamente todos os *loci*, exceto em SAG1 e APICO o que o torna com uma configuração genotípica bastante similar ao genótipo BrIII. Também como no caso do genótipo clonal brasileiro, o genótipo #32 mostrou-se avirulento para camundongos. Este isolado encontrado foi proveniente de uma galinha do município de Aquidauana e foi semelhante aos isolados TgCkBr111 e 112 encontrados por Dubey et al. (2007a) no estado do Pará e o isolado TgCkBr182 descrito por de Oliveira et al. (2009) e genotipado por Dubey et al. (2008b) encontrado no estado do Ceará. Em todos estes trabalhos este genótipo também não foi letal para os camundongos.

Em todos estes estudos, os pesquisadores utilizaram PCR-RFLP com 11 a 12 marcadores moleculares. Entretanto, em nem todos os estudos atualmente publicados fora do Brasil, são utilizados pelo menos onze marcadores (SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico) para mais comparações. Os trabalhos realizados com genotipagem de isolados de *T. gondii* em Illinois e na África (DUBEY et al., 2007c; VELMURUGAN et al., 2008) utilizaram os mesmos 11 marcadores que os utilizados neste estudo, exceto por CS3. Já nos estudos mais recentes publicados na Argentina (BASSO et al., 2009) e na China (ZHOU et al., 2009) não foram utilizados, respectivamente os marcadores SAG1 e o novo SAG2 (SU et al., 2006).

O quarto genótipo identificado (denominado #60) foi obtido do isolado simples TgCkBr197. Sua origem também foi do município de Aquidauana em propriedade na qual já havia sido isolado o outro genótipo também inédito (#59). Ambos estão estreitamente relacionados do ponto de vista genotípico. Pela análise da rede filogenética disposta na Figura 6, os isolados até então detectados com configurações genotípicas similares às dos genótipos #59 e #60 tem sido encontrados nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (genótipos #53-

#60). Em relação à virulência para camundongos, os genótipos #59 e #60 diferem marcadamente, sendo o primeiro avirulento e o segundo 100% letal. Ressalta-se que dentre os 12 marcadores empregados, os genótipos em tela apenas diferem em dois *loci*, o L358 e SAG2.

O quinto e último genótipo (genótipo misto) foi obtido do isolado (TgCkBr198) de uma galinha da propriedade 2, no município do Rio Verde do MT. Este genótipo apresentou uma combinação de alelos clonais I, II e III em praticamente todos os *loci* exceto SAG3, BTUB e CS3 cuja digestão dos respectivos *loci* demonstrou respectivamente os alelos III, III e II.

Alelos distintos dos arquétipos I, II e III foram encontrados após digestão dos marcadores SAG1 e C22-8 nos dois genótipos identificados pela primeira vez neste estudo (#59 e #60) e no genótipo misto, corroborando com outros trabalhos semelhantes (DUBEY et al., 2007a,b).

A análise da variabilidade genética de isolados de galinha revela uma estrutura populacional bastante particular. Os isolados podem ser subdivididos em populações claramente diferenciáveis entre si.

A estrutura populacional com seis sub-populações revelada pela rede filogenética foi testada com auxílio de análises de parâmetros de genética populacional como os índices de fixação gênica, número de migrantes entre populações por geração e pelo teste de desequilíbrio de ligação.

O teste do desequilíbrio de ligação é realizado para se verificar se dois alelos distintos são encontrados em um mesmo isolado com frequência superior a esperada se a distribuição de alelos fosse aleatória (TIBAYRENC, 1998). A análise de todos os táxons dispostos na rede filogenética revelou que a grande maioria dos pares de alelos apresenta desequilíbrio de ligação significativo, sugerindo que a população estudada tem uma estrutura populacional clonal.

Uma vez demonstrada a clonalidade da população estudada, os diversos clados revelados foram testados para os parâmetros de índice de fixação F_{st} e para o parâmetro M (número de migrantes entre populações por geração).

No primeiro caso, o índice de fixação F_{st} , trata-se de uma medida indireta de variabilidade e pode oscilar entre 0 a 1. Valores próximos de zero indicam que a probabilidade de que dois alelos (homólogos, evidentemente) tomados de uma mesma população sejam iguais é similar à probabilidade de que estes mesmos alelos tomados de indivíduos de populações distintas também sejam iguais (SLATKIN, 1991). Tipicamente, valores acima de 0,15 indicam significativa diferença entre populações, ou seja, que a primeira probabilidade é significativamente maior que a segunda (FRANKHAM, 2002).

Com o parâmetro M estima-se o número de migrantes (indivíduos) entre populações, ou seja, de indivíduos que devem migrar de uma população para outra a cada geração, contribuindo para a diversidade das populações (FRANKHAM, 2002). Esclarecendo, quanto maior o valor de M , maior é a troca gênica entre as populações. Tipicamente, um número estimado em um migrante por geração faz com que não aconteça a diferenciação entre as populações (FRANKHAM, 2002). Desta forma, valores de M estimados em menos de um indivíduo migrante por geração tendem a indicar o isolamento genético entre as populações consideradas.

Pelos parâmetros acima, todas as populações definidas na rede filogenética parecem ser diferenciadas entre si, o que sugere uma clonalidade da estrutura populacional de *T. gondii* em galinhas. Este isolamento populacional certamente não está relacionado ao isolamento geográfico entre os genótipos, pois nota-se claramente pela figura 6 que as populações são formadas por indivíduos provenientes de diferentes localidades. Também o efeito de diferenças de hospedeiros não podem explicar o isolamento destas populações visto que todos os isolados considerados são provenientes da mesma espécie animal.

A evolução clonal das distintas populações não deve ser devido à impossibilidade de trocas gênicas entre indivíduos de populações diferentes, embora esta hipótese nunca tenha sido demonstrada experimentalmente. Ou seja, não se sabe com certeza se, por exemplo, indivíduos pertencentes à população 1 poderiam recombinar com indivíduos da população 3 com a mesma eficiência que os indivíduos da população 1 podem recombinar-se entre si.

Uma explicação mais plausível para esta distribuição populacional pode ser a ocorrência de clonalidade epidêmica (TIBAYRENC, 1995; SMITH et al., 1993), resultante da rápida disseminação de determinadas configurações genótípicas por meio de reprodução

assexuada do parasito em decorrência da transmissão entre hospedeiros por meio de cistos teciduais.

Organismos que possuem atividade sexual têm oportunidades para recombinação alélica e, portanto fluxo gênico considerável. Estes organismos, como é o caso do *T. gondii* tendem a ter uma estrutura populacional panmítica, ou seja, sem estrutura populacional definida. Porém, no caso do *T. gondii*, a transmissão via cistos e, portanto a reprodução assexuada do parasito, é um evento freqüente e pode então fazer com que a estrutura populacional se apresente com evolução com “surtos” de clonalidade. Este parece ser o caso do *T. gondii* em galinhas no Brasil.

Conforme citado anteriormente, a região Pantaneira na qual se situavam as propriedades, apesar de próxima a capital do estado (300 Km), tem o acesso dificultado principalmente durante os 8 meses de chuvas que ocorrem na região. Além disso, as estradas são pouco conservadas e as propriedades, grandes latifúndios, concentram várias famílias de empregados que moram nas mesmas praticamente por toda sua vida. O alimento geralmente é adquirido na cidade mais próxima (Rio Negro ou Rio Verde do MT) quando não é levado pelo proprietário que algumas vezes, vai à propriedade a cada um ano (dados adquiridos com os funcionários).

Esta é uma região importante para a pesquisa de variantes de *T. gondii*, pois além do contato de animais domésticos com silvestres e vice-versa o contato do homem com os mesmos é intenso e praticamente diário. Infelizmente estudos sobre a toxoplasmose humana na região praticamente não existem. O conhecimento acerca da origem dos genótipos encontrados nestes animais para a região é importante pelo fato do estreito contato do homem com hospedeiros definitivos e intermediários do parasita. Surtos de toxoplasmose tem sido relatadas com bastante freqüência no mundo sem definição da causa exata do foco (CHOI et al., 1997; DOGANCI et al., 2006; DEMAR et al., 2007). De acordo com Grigg e Sundar (2009) estudos sistemáticos deveriam ser realizados para investigar a relação filogeográfica entre os surtos e as cepas endêmicas circulantes em comunidades atingidas, antes, durante e depois deste surto. Acompanhar as fontes, a transmissão dinâmica e a origem molecular de cepas silvestres associadas a surtos são importantes para a identificação de bases moleculares provenientes de ciclos silvestres que possuem potencial epidêmico. Os surtos e a emergência

da toxoplasmose impactam não só pessoas, mas também animais que compartilham o mesmo nicho ecológico.

7 CONCLUSÕES

- √ A frequência de ocorrência de infecção por *T. gondii* em galinhas da região do Pantanal da Nhecolândia, Mato grosso do sul, foi alta;
- √ A PCR direcionada ao gene B1, embora não seja confirmatória da viabilidade do parasito, pode ser empregada como método de triagem para a escolha de galinhas infectadas por *T. gondii*;
- √ Animais com títulos acima de 10 devem ser priorizados na triagem de animais para o bionesaio, pois neles, as chances de isolamento do parasito são maiores;
- √ A soroconversão em camundongos experimentalmente infectados não é um bom indicador de isolamento do agente;
- √ A diversidade genética encontrada entre isolados da região da Nhecolândia é similar a diversidade para outras regiões do País;
- √ Sobre o uso do *locus* CS3 como marcador de virulência, o resultado obtido neste estudo não permite associar um padrão RFLP do referido *locus* com virulência em camundongos;
- √ As cepas arquétipas I, II e III parecem não estar distribuídos nas galinhas da região;
- √ O isolado com genótipo BrIII isolado neste estudo não foi patogênico para os camundongos, assim como outros isolados com este genótipo oriundos de outras localidades do Brasil;
- √ A população de *T. gondii* isolada de galinhas no Brasil apresenta-se estruturada, a despeito da diversidade observada entre os diversos genótipos.

REFERÊNCIAS

- AIGNER, C. P. **Análise molecular de *Toxoplasma gondii* em tecidos de *Gallus gallus* utilizando o PCR em tempo real**. 2008. 38 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura) - Universidade Paranaense, Umuarama, PR, 2008.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETT, I. D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **Journal Infectious Diseases**, v. 186, p. 684- 89, 2002.
- AMARAL FILHO, Z. P. Solo do Pantanal Mato-Grossense. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICO DO PANTANAL, 1., 1984, Corumbá. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. p. 91-96.
- AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. (Ed.). **Toxoplasmose**. 4th ed. São Paulo: Editora Sarvier, 1995. p.154.
- AQUIZERATE F.; CAZENAVE J.; POIRIER L.; VERIN P. H.; CHEYROU A.; BEGUERET J.; LAGOUTTE F. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humour by the polymerase chain reaction. **British Journal Ophthalmology**, v. 7, n. 1, p. 107-109, 1993.
- ARAÚJO, F. A. P.; SILVA, N. R. S.; CHAPLIN, E. L.; BIGATTI, L. E. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em frangos abatidos para consumo humano em Porte Alegre, Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária - UFRGS**, v. 17, p. 23-28, 1989.
- ARAÚJO, F. G. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, n. 2, p. 105-111, 1970.
- ARAÚJO, F. R.; SARTI, E. C; BALBUENA, C. B; CARVALHO, C. M. E.; RAMOS J. K. Levantamento sorológico para *Toxoplasma Gondii* em Caprinos na Microrregião de Campo Grande, Mato Grosso do sul. **Ensaio e Ciência**, v. 2, p. 141-148, 1998.
- ASGARI, Q.; FARZANEH, A.; KALANTARI, M.; AKRAMI MOHAJERI, F.; MOAZENI, M.; ZARIFI, M.; ESMAEILZADEH, B.; MOTAZADIAN, M. H. Seroprevalence of Free-Ranging Chicken Toxoplasmosis in Sub-Urban Regions of Shiraz, Iran. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 3, p. 262-264, 2006.
- ASPINALL, T. V.; GUY, E. C.; ROBERTS, K. E.; JOYNSON, D. H.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 97-103, 2003.

ASPINALL, T. V.; MARLRR, D.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by Polymerase Chain Reaction – food for thought? **Internatoinal Journal for Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 1193-1199, 2002.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Short protocols in molecular biology**. 4th ed. New York: Wiley, 1999. sec. 2-3, 2-7.

AZEVEDO, D. S.; JAMRA, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. Isolamento de oocistos de *Toxoplasma gondii* em dois bairros do Recife (PE). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 31-36, 1983.

BARBOSA, S. A. A. Survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by modified agglutination teste in chicken slaughtered for consumption in Belém city, Northern Brazil. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 66, n. 2, p. 228, 2007.

BARUZZI, R. G. Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the Indians of the Upper Xingu River, Central Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, n. 2, p. 93-104, 1970.

BASSO, W.; MORÉ, G.; QUIROGA, M. A.; PARDINI, L.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; VALENZUELA, M. C.; BALDUCCHI, D.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; VENTURINI, M. C. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 201-206, 2009.

BIANCIFIORI, F.; RONDINI, C.; GRELLONI, V.; FRESCURA, T. Avian Toxoplasmosis: Experimental infection of Chicken and Pigeon. Comp. Immun. **Microbiology and Infectious Disease**, v.9, n. 4, p. 337-346, 1986.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 607-623, 2000.

BONNA, I. C. F.; FIGUEIREDO, F. B.; COSTA, T.; VICENTE, R. T.; SANTIAGO, C. A. D.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B.; MILLAR, P. R.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 186-189, 2006.

CAMARGO, M. C. V.; ANTUNES, C. M. F.; CHIARI, C. A. Epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* no Município de Ribeirão das Neves, MG.: 1- Importância dos animais domésticos como fonte de infecção do *T. gondii* para o homem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 3, p. 211-214, 1995.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmosis. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. (Ed.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996. p. 165 -174.

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection Immunity**, v. 21, p. 55-58, 1978.

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ROCCA, A.; BELÉM, Z. R. Um teste prático para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de imunofluorescência e imunoenzimática de captura de IgM. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 22, n. 6, p. 196-201, 1986.

CAMARGO, M. E.; LESER, P. G.; ROCCA, A. Detection of IgM anti-*Toxoplasma* antibodies in acute acquired and congenital toxoplasmosis after protein A treatment of serum. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 5, p. 201-206, 1983.

CAMARGO, M. E.; MOURA, M. E. G.; LESER, P. G. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, p. 279-285, 1989.

CARME, B.; AJZENBERG, D.; DEMAR, M.; SIMON, S.; DARDE, M. L.; MAUBERT, B.; THOISY, B. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel Monkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 132-135, 2009.

CHABBERT, E.; LACHAUD, L.; CROBU, L.; BASTIEN, P. Comparison of two widely used PCR primer system for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood and tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1719-1722, 2004.

CHAKRABORTY, R.; RAO, C. R. Measurement of genetic variation for evolutionary studies. **Handbook of Statistics**, v. 8, p. 271-316, 1991.

CHOI, W. Y.; NAM, H. W.; KWAK, N. H.; HUH, W.; KIM, Y. R.; KANG, M. W.; CHO, S. Y.; DUBEY, J. P. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 1280-1282, 1997.

CLARK, D. P.; RUSSEL, L. D. **Molecular biology**: made simple and fun. Illinois: Cache River Press, 1997. p. 235-268.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; HOWE, D. K.; RODERICK, C. L.; DUBEY, J. P.; THOMAS, N. J.; BAETEN, L. A. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 526-530, 2000.

COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; CAMILLO-COURA, L.; MARZOCHI, M. C. A.; AMENDOEIRA, M. R. R. Levantamento dos resultados das reações de Imunofluorescência Indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatório ou gestantes do Rio de Janeiro realizadas durante os anos de 1971 a 1977. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 23, n. 2, p. 48-56, 1981.

DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 786-794, 1992.

DE MELLO, F. On a toxoplasmid of *Fulica atra* L. with special reference to a probable sexuality of agametes. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 1, p. 705–709, 1935.

DE MELLO, F. Preliminary note on a new haemogregarine found in the pigeon's blood. **Indian Journal of Medical Research**, v. 3, p. 93–94, 1915.

DE OLIVEIRA, L. N.; COSTA, L. M.; MELO, C. B.; 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.

DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; MAUBON, D.; DJOSSOU, F.; PANCHOE, D.; PUNWASI, W.; VALERY, N.; PENEAU, C.; DAIGRE, J. L.; AZNAR, C.; COTTRELLE, B.; TERZAN, L.; DARDÉ, M. L.; CARME, B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n.7, p. 88–95, 2007.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; ALISON, F.; BAUDELLOT, J.; GERBEAUX, J.; LELONG, M. Etude epidemiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. **Revue Française d'Etudes Cliniques et Biologiques**, v. 10, p. 952–958, 1965.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 562–568, 1980.

DEVADA, K.; ANANDAN, R.; DUBEY, J. P. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, India. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 621–622, 1998.

DINIZ, E. M. A.; CAMARGO, M. E.; COSTA VAZ, F. A. Toxoplasmose congenital. In: DINIZ, E. M. A.; COSTA VAZ, F. A. **Infecções congênitas e perinatais**. São Paulo: Atheneu, 1991. p. 31–72.

DOGANCI, L.; TANYUKSEL, M.; ARAZ, E. R.; BESIRBELLIOGLU, B. A.; ERDEM, U.; OZOGUZ, C. A.; YUCEL, N.; CIFTCIOGLU, A. A probable outbreak of toxoplasmosis among boarding school students in Turkey. **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, p. 672–674, 2006.

DORNY, P.; VAN AKEN, D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in goats in Sri Lanka. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 83–85, 1992.

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

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

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

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals, In: KREIER, J. P. (Ed.). **Parasitic protozoa**, New York: Academic Press, Inc., v. 6, 1993, p. 150–158.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 11, p. 1693-1698, 1994.

DUBEY, J. P.; ADAMS, D. S. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy goats from 1982 to 1984. **Journal American Veterinary Medicine Associates**, v. 196, n. 2, p. 295-296, 1990.

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

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, p. 1239–1243, 1987.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Medicine Journal**, v. 19, p. 337-339, 1987.

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

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, p. 36-40, 2006c.

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

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

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H. ; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T.; DAVIS, M. F.; MORISHITA, T. Y. *Toxoplasma gondii* Isolates From Free-Ranging Chickens From the United States. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p 1060-1062, 2003b.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GANNARI, S. M.; RAGOZZO, 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, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; HILALI, M.; EL-GHAYSH, A.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; LEHMANN, T. Isolation and molecular

characterization of *Toxoplasma gondii* from chicken and ducks from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 89-95, 2003a.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocysts shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 851-853, 2003d.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C. B.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1082–1093, 2005d.

DUBEY, J. P.; HUONG, L. T. T.; LAWSON, B. W. L.; SUBEKTU, D. T.; TASSI, P.; CABAJ, W.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; KWOK, O. C. K.; SU, C. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 68–71, 2008a.

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

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. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 229-234, 2003c.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *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, 2004a.

DUBEY, J. P.; ODENING, K. Toxoplasmosis and related infections. In: SAMUEL, B.; PYBUR, M.; KOCAN, A. M. (Ed.). **Parasitic diseases of wild mammals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001. p. 478–519.

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

DUBEY, J. P.; SALANT, H.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; SPIRA, D.; HAMBURGER, J.; LEHMANN, T. V. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chicken in Israel, and public health implications of free-range farming. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 317-322, 2004b.

DUBEY, J. P.; SU, C.; OLIVEIRA, J. B.; MARALES, J. A.; BOLAÑOS, R. V.; SUNDAR, N.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii*

isolates in free range chickens from Costa Rica, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p.29-3, 2006e.

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

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, p. 47-53, 2006d.

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

DUBEY, J. P.; WEBB, D. M.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C. H.; 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, p. 207-212, 2007c.

DUBEY, J. P.; VIANNA, M. C. B.; SOUSA, S.; CANADÁ, N.; 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, 2006b.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 155-171, 1999.

EVANS R. Life cycle and animal infection. In: HO-YEN, D. O.; JOSS, A. W. L. (Ed.). **Human toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 26-27, 1992.

FERRARONI, J. J.; LACAZ, C. S. Prevalência de anticorpos contra agentes causadores da hepatite, malária, sífilis e toxoplasmose em cinco populações humanas distintas da Amazônia Brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, n. 3, p. 155-161, 1982.

FERREIRA, R. A.; MINEO, J. R.; DUARTE J. M.; SILVA, D. A. O.; PATARROYO, J. H. Toxoplasmosis in Naturally Infected Deer from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 4, p. 896-899, 1997.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; LOPES, A. H. A.; SENEFFONTE, F. R. A.; SOUZA JÚNIOR, V. G.; BOTELHO, C. A.; FIGUEIREDO, M. A.; DUARTE, G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 8, p 442-449, 2005.

FILISSETTI, D.; PERNOT-MARINO, E.; VILLARD, O.; CANDOLFI, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4826–4828, 2003.

FONDON, J. W.; GARNER, H. R. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. **National Academy of Sciences**, v. 101, p. 18058-18063, 2004.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. New York: Cambridge University Press, 2002, 617p.

FREIMER, N. B.; SLATKIN, M. Evolution and mutational processes. Variation in the human genome. **CIBA Foundation Symposia**, v. 197, p. 51-67, 1996.

FRENKEL, J. K.; RUIZ, A. Isolation of *Toxoplasma* from cat feces deposited in false attices of homes in Costa Rica. **Journal Of Parasitology**, v. 63, p. 931-932, 1977.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. **Journal of Infections Disease**, v. 126, p. 664-673, 1972.

FRICKER-HIDALGO, H.; PELLOUX, H.; RACINET, C.; GREFFENSTETTE, I.; BOST-BRUT, C.; GOULLIER-FLEURET, A.; AMBROISE-THOMAS, P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo, and in vitro cultures. **Placenta (Official Journal of the International Federation of Placenta Association)**, v. 19, n. 7, p. 545 – 549, 1998.

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, p.1566-1570, 2001.

GALLI, S.; BELINATO, F. C.; LUCAS, T. M.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; DA SILVA, A. V. Infecção Experimental 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.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 267-271, 2006.

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

GHORBANI, M.; GHARAVI, M. J.; KAHNAMOUI, A. Serological and parasitological investigations on *Toxoplasma* infection in domestic fowls in Iran. Iranian. **Journal Public Health**, v. 19, p. 9-17, 1990.

GOLDSTEIN, D. B.; LINARES, A. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite *loci*. **Genetics**, v. 139, p. 463-471, 1995.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p. 161-65, 2001.

GRIGG, M. E.; SUNDAR, N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 925-933, 2009.

GUIMARAES, A. C.; KAWARABAYASHI, M.; BORGES, M. M.; TOLEZANO, J. E.; ANDRADE, H. F. J. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 479-483, 1993.

HOHLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J. M.; THULLIEZ, P.; FORESTIER, F.; VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 11, p. 695 - 699, 1994.

HOLLIMAN, R. E.; RAYMOND, R.; RENTON, N.; JOHNSON, J. D. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidemiology Infectious**, v. 112, p. 399-408, 1994.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

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

HO-YEN, D. O.; JOSS A.W.; BALFOU, R. A.H.; SMYTH, E.T.; BAIRD, D.; CHATTERTON, J.M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 10, p. 910 - 913, 1992.

HUSON, D. H. SplitsTree: A program for analyzing and visualizing evolutionary data. **Bioinformatics**, v. 14, n. 10, p. 68–73, 1998.

HUTCHINSON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 206, n. 4987, p. 961-962, 1965.

JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.

JACOBS L.; MELTON, M. L. Toxoplasmosis in chickens. **The Journal of Parasitology**, v. 52, n. 6, p. 1158-1162, 1966.

JACOBS, L.; LUNDE, M. A hemagglutination test for toxoplasmosis. **Journal of Parasitology**, v. 43, p. 308-314, 1957.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 46, p. 11–21, 1960.

JAMRA, L. M. F.; GUIMARÃES, E. C. Conversão sorológica para toxoplasmose em crianças de um centro de saúde de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 23, n. 3, p. 133-137, 1981.

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

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 1371-1374, 2003.

JOSEPH, P.; CALDERÓN, M. M.; GILMAN, R. H.; QUISPE, M. L.; COK, J.; TICONA, E.; CHAVEZ, V.; JIMENEZ, J. A.; CHANG, M. C.; LOPEZ, M. J.; EVANS, C. A. Optimization and evaluation of o PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4499–4503, 2002.

KANETO, C. N.; COSTA, A. J; PAULILLO, A. C.; MORAES, F. R.; MURAKAMI, T. O.; MEIRELLES, M. V. Experimental Toxoplasmosis in broiler chicks. **Veterinary Parasitology**, v. 69. p. 203-210, 1997.

KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 10, p. 184-188, 1994.

LARANGEIRA, N. L.; ISHIZUKA, M. M.; HYAKUTAKE, S. Prevalência da toxoplasmose eqüina avaliada pelo Teste de Imunofluorescência Indireta Mato Grosso do Sul, Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 99, n. 2, 1995.

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

LEHMANN, T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infection and Genetic Evolution**, v. 4, p. 107-114, 2004.

LEVINE, N. D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **Journal of Protozoology**, v. 24, n. 1, p. 36-41, 1977.

LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.

LITERÁK, I.; HEJLÍČEK, K. Incidence of *Toxoplasma gondii* in population of domestic birds in the Czech Republic. **Avian Pathology**, v. 22, p. 275-281, 1993.

MARULLAZ, M. Au sujet d'un toxoplasme des oiseaux. **Bulletin Société Pathology Exotic**, v. 6, p. 323-326, 1913.

MEDEIROS S. M.; LOPES C. W. G. Pleomorfismo de uma amostra acistogênica de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) (Apicomplexa: *Toxoplasmatinae*) isolada de uma galinha naturalmente infectada. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 71-73, 1996.

MEIRELES, L. R. **Estudo das fontes de infecção da Toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo**. 2001. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MEIRELES, M. V.; PAULILLO, A. C.; DA COSTA, A. J.; MORAES, F. R.; DE ÁVILA, F. A.; DA SILVA, G. S. Correlação entre *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium baileyi* em frangos de corte experimentalmente infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 105-112, 1995.

MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 639-641, 1998.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O.; KINNEY, S.; PRESS, C.; REMINGTON, J. S. VIDAS - test for avidity of *Toxoplasma* specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2504-2508, 2002.

NETO, J. O.; AZEVEDO, S. S.; GENNARI, S. M.; FUNADA, M. R.; PENA, H. F.; ARAÚJO, A. R.; BATISTA, C. S.; SILVA, M. L.; GOMES, A. A.; PIATTI, R. M.; ALVES, C. J. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 329-332, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 6th ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. p. 114-153.

NEVES, J. M.; NASCIMENTO, L. B.; RAMOS, J. G. L.; MARTINS-COSTA, S. H. Toxoplasmose na gestação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 16, n. 6, p. 197-202, 1994.

NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v.148, p. 369-372, 1909.

NÓBREGA, P.; TRAPP, E.; GIONANNONI, M. Toxoplasmose espontânea da galinhas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 22, p. 43-49, 1955.

OWEN, M. R.; TREES, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 382-384, 1999.

PELLOUX, H.; WEISS, J.; SIMON, J.; MUET, F.; FRICKER-HIDALGO, H.; GOULLIER-FLEURET, A.; AMBROISE-THOMAS, P. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 11-15, 1996.

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

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, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, L. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São 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.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, p. 214-223, 2007.

PFEFFERKORN, E. R. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In: WYLER, D. J. (Ed.). **Modern parasite biology**. New York: W.H. Freeman, 1990. p. 26-50.

RAGOZO, A. M. A. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos**. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REMYINGTON, J. S.; DESMONTS, G. Congenital Toxoplasmosis: variability in the IgM-fluorescent Antibody response and some pitfalls in diagnosis. **Journal Pediatric**, v. 83, n. 1, p. 27-30, 1990.

REMYINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTROYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941 - 945, 2004.

RICHTZENHAIN, L. J. Diagnóstico sorológico e molecular em medicina veterinária – conceitos básicos. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *NEOSPORA*

CANINUM, 1., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2005, p. 9-10.

ROSE, N. R.. General Methods Immunological . In: DE MACÁRIO, E. C.; FOLDS, J.D.; LANE, C. H.; NAKAMURA, R. M. (Ed). **Manual of clinical laboratory immunology**. 5th. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1997. p. 495-502.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 1161-1166, 1980.

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

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunochemical phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, p. 660-663, 1948.

SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. **Science**, v. 85, p. 336-338, 1937.

SIBLEY, L. D.; HOWE, D. K. Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 219, p. 3-15, 1996.

SILVA, D. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SHENT, S. K.; KWOKT, O. C. H.; LEHMANT, 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, J. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 1703-1711, 1998.

SILVA, R. A. M. S. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses from Pantanal, Brazil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 12, n. 1/2, p. 20-24, 2005.

SILVESTRE FILHO, D. F.; ROMEU, N. Desenvolvimento e características regionais do Pantanal. **Características e potencialidades do Pantanal** . IPEA. Instituto de Planejamento Econômico e Social. Gráfica Brasil: Brasília, DF, 1974. p. 215-218.

SMITH, J. M.; SMITH, N. H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B. G. **How clonal are bacteria?**. 3th. ed. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American, v. 90, n.10, p. 4384-4388, 1993.

SMITH, J. E.; REDUCK, N. R. *Toxoplasma gondii* strain variations and pathogenicity. In: CARY, J. W.; LINZ, J. E.; BHATNAGAR, B. (Ed.). **Microbial food-borne diseases: mechanisms of pathogenesis and toxin syntesis**. Philadelphia: Technnomic Publishing, Mancaster, 2000, p. 405-431.

SLATKIN, M. Inbreeding coefficients and coalescence times. **Genetics Research**, v. 58, p. 167-175, 1991.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo Nota preliminare pel. **Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo**, n. 3, p. 109–112, 1908.

SREEKUMAR, C.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; LEHMANN, T.; RAMAN, M.; BHALERAO, D. P.; VIANNA, M. C. B.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 187-194, 2003.

STACCHISSINI, A. V. M. *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em caprinos do estado de São Paulo: perfis soro-epidemiológicos e co-infecção com o vírus da artrite-encefalite caprina. 2005. 105 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2005.

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, p. 841-848, 2006.

TAGLIANETTI, T. B. B. **Análise de variação e estrutura populacional em loci de microsátélites baseada em distâncias genéticas**. 2007. 213 f. Dissertação (Mestrado em estatística) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 69-139, 1997.

TEUTSCH, S. M.; JURANEK, D. D.; SULZER, A.; DUBEY, J. P.; SUKES, R. K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 300, p. 695-699, 1979.

TIBAYRENC M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology**, v. 36, p. 47-115, 1995.

TIBAYRENC M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 401-29, 1996.

TIBAYRENC M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85-104, 1998.

VELMURUGAN, G. V.; DUBEY, J. P.; SU, C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 314-318, 2008.

VERGARA, T. R. C. Epidemia de toxoplasmose do sistema nervoso central em enfermos com AIDS na cidade do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v. 59, n. 6, p. 397-406, 1985.

VIRELLA, G. Humoral Immune Response and its Induction by active immunization. **Medical Immunology**, 6th. Ed. New York: CRC Press, 1998. p. 159-164.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 87, p. 211–216, 1954.

YAI, L. E. O. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do estado de São Paulo**. 2007. 138 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

YAI, L. E. O.; VIANNA, M. C. B.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENNARI, S. M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 227–234, 2003.

YAKIMOFF, W. L.; KOHL-YAKIMOFF, N. *Toxoplasma canis* (Mello). **Archives Protistenk.**, v. 27, p. 195–206, 1912.

ZHOU, P.; ZHANG, H.; LIN, R. Q.; ZHANG, D. L.; SONG, H. Q.; SU, C.; ZHU, X. Q. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. **Parasitology International**, v. 58, p. 193-195, 2009.

APÊNDICE A – Relação de galinhas soropositivas para *T. gondii* e seus títulos no MAT, obtenção de isolamentos nos camundongos (camundongos PCR positivos), achados de cistos nos cérebros dos camundongos, genotipagem dos isolados e relação dos grupos experimentais de camundongos.

Galinha	Título (MAT) Galinha	PCR (Galinhas)	Isolamentos (Camundongos)			Camundongos		
			Tci	Isolado	Genótipo	Grupo	PCR positivos	Cistos
33	5	N	6	Ni	-	19	0 ^(0%)	0 ^(0%)
44	5	N	5	Ni	-	20	0 ^(0%)	0 ^(0%)
49	5	N	6	Ni	-	21	0 ^(0%)	0 ^(0%)
36	5	N	4	Ni	-	22	0 ^(0%)	0 ^(0%)
18	5	N	6	Ni	-	23	0 ^(0%)	0 ^(0%)
21	5	N	6	Ni	-	24	0 ^(0%)	0 ^(0%)
5	5	N	6	Ni	-	25	0 ^(0%)	0 ^(0%)
15	10	N	5	Ni	-	18	0 ^(0%)	0 ^(0%)
20	10	N	6	Ni	-	26	0 ^(0%)	0 ^(0%)
34	10	N	6	Ni	-	27	0 ^(0%)	0 ^(0%)
16	20	N	4*	Ni	-	8	0 ^(0%)	0 ^(0%)
4	20	P	5	Ni	-	15	0 ^(0%)	0 ^(0%)
28	320	P	4*	Ni	-	4	0 ^(0%)	0 ^(0%)
31	320	P	5	TgCkBr195	#30	6	4 ^(80%)	3 ^(60%)
27	320	P	6	Ni	-	17	0 ^(0%)	1 ^(16,7%)
1	640	P	5	TgCkBr196	#32	9	4 ^(80%)	5 ^(100%)
48	1.280	P	5	TgCkBr189	#59	3	4 ^(80%)	3 ^(60%)
3	1.280	P	5	TgCkBr190	#59	7	5 ^(100%)	4 ^(80%)
7	1.280	P	5	TgCkBr192	#59	14	2 ^(40%)	2 ^(60%)
38	2.560	P	5	Ni	-	12	0 ^(0%)	0 ^(0%)
42	2.560	P	6	TgCkBr193	#59	16	1 ^(16,7%)	3 ^(50%)
29	5.120	P	3	TgCkBr198	Misto	1	3 ^(100%)	Morte aguda

Galinha	Título (MAT) Galinha	PCR (Galinhas)	Isolamentos (Camundongos)			Camundongos		
			Tci	Isolado	Genótipo	Grupo	PCR positivos	Cistos
11	5.120	P	5	TgCkBr188	#59	2	4 ^(80%)	3 ^(60%)
24	5.120	P	3**	TgCkBr197	#60	11	3 ^(100%)	Morte aguda
19	5.120	P	4*	Ni	-	13	0 ^(0%)	0 ^(0%)
43	10.240	P	4*	TgCkBr194	#30	5	3 ^(80%)	2 ^(50%)
25	10.240	P	5	TgCkBr191	#59	10	5 ^(100%)	2 ^(40%)

Tci = Total de camundongos inoculados; N = negativo; P = positivo; Ni = Não isolado. Os isolamentos de *T. gondii* nos camundongos foram considerados quando a amostra foi positiva na PCR.

* cinco camundongos inoculados e uma morte pós-inoculação

** cinco camundongos inoculados e duas mortes pós-inoculação

APÊNDICE B – Distribuição individual de todos os camundongos bioensaiados que não morreram de infecção aguda, resultados do PCR, número de lâminas com bradizoítos e MAT (1:25) nos camundongos e relação das galinhas cujos tecidos foram inoculados nos camundongos e resultados (títulos) da MAT nas mesmas.

Identificação Camundongos	PCR camundongo	Nº da Galinha	Bradizoítos* (Lâminas positivas)	Título MAT Galinha	MAT Camundongo (1:25)
G2 CAB	+	11	1	5120	+
G2 CAU	+	11	0	5120	+
G2 DOR	-	11	1	5120	+
G2 BAR	+	11	0	5120	+
G2 PAT	+	11	1	5120	+
G3 CAB	-	48	0	1280	+
G3 CAU	+	48	2	1280	+
G3 DOR	+	48	1	1280	+
G3 BAR	+	48	0	1280	+
G3 PAT	+	48	1	1280	-
G4 CAB	-	28	0	320	-
G4 CAU	-	28	0	320	-
G4 DOR	-	28	0	320	-
G4 BAR	-	28	0	320	-
G5 CAB	+	43	1	10240	+
G5 DOR	+	43	0	10240	-
G5 BAR	+	43	2	10240	+
G5 PAT	-	43	0	10240	-
G6 CAB	+	31	0	320	+

Identificação Camundongos	PCR camundongo	Nº da Galinha	Bradizoítos* (Lâminas positivas)	Título Mat Galinha	Mat Camundongo (1:25)
G6 CAU	+	31	1	320	+
G6 DOR	-	31	2	320	+
G6 BAR	+	31	2	320	+
G6 PAT	+	31	0	320	-
G7 CAB	+	3	1	1280	+
G7 CAU	+	3	2	1280	+
G7 DOR	+	3	1	1280	+
G7 BAR	+	3	0	1280	+
G7 PAT	+	3	2	1280	+
G8 CAB	-	16	0	20	-
G8 CAU	-	16	0	20	-
G8 BAR	-	16	0	20	-
G8 PAT	-	16	0	20	-
G9 CAB	+	1	1	640	+
G9 CAU	+	1	2	640	+
G9 DOR	+	1	1	640	+
G9 BAR	+	1	1	640	+
G9 PAT	-	1	1	640	-
G10 CAB	+	25	0	10240	+
G10 CAU	+	25	0	10240	+
G10 DOR	+	25	1	10240	+
G10 BAR	+	25	0	10240	+
G10 PAT	+	25	1	10240	+
G12 CAB	-	38	0	2560	-

Identificação Camundongos	PCR camundongo	Nº da Galinha	Bradizoítos* (Lâminas positivas)	Título Mat Galinha	Mat Camundongo (1:25)
G12 CAU	-	38	0	2560	-
G12 DOR	-	38	0	2560	-
G12 BAR	-	38	0	2560	-
G12 PAT	-	38	0	2560	-
G13 CAB	-	19	0	5120	-
G13 CAU	-	19	0	5120	-
G13 DOR	-	19	0	5120	-
G13 BAR	-	19	0	5120	-
G14 CAB	+	7	0	1280	+
G14 CAU	-	7	0	1280	-
G14 DOR	-	7	1	1280	+
G14 BAR	-	7	0	1280	-
G14 PAT	+	7	1	1280	-
G15 CAB	-	4	0	20	-
G15 CAU	-	4	0	20	-
G15 DOR	-	4	0	20	-
G15 BAR	-	4	0	20	-
G15 PAT	-	4	0	20	-
G16 CAB	-	42	0	2560	-
G16 CAU	-	42	0	2560	-
G16 DOR	-	42	0	2560	-
G16 BAR	+	42	1	2560	+
G16 PAT d	-	42	1	2560	-
G16 PAT e	-	42	1	2560	-

Identificação Camundongos	PCR camundongo	Nº da Galinha	Bradizoítos* (Lâminas positivas)	Título Mat Galinha	Mat Camundongo (1:25)
G17 CAB	-	27	0	320	-
G17 CAU	-	27	1	320	-
G17 DOR	-	27	0	320	-
G17 BAR	-	27	0	320	-
G17 PAT d	-	27	0	320	-
G17 PAT e	-	27	0	320	-
G18 CAB	-	15	0	10	-
G18 CAU	-	15	0	10	-
G18 DOR	-	15	0	10	-
G18 BAR	-	15	0	10	-
G18 PAT	-	15	0	10	-
G19 CAB	-	33	0	5	-
G19 CAU	-	33	0	5	-
G19 DOR	-	33	0	5	-
G19 BAR	-	33	0	5	-
G19 PAT d	-	33	0	5	-
G19 PAT e	-	33	0	5	-
G20 CAB	-	44	0	5	-
G20 CAU	-	44	0	5	-
G20 DOR	-	44	0	5	-
G20 BAR	-	44	0	5	-
G20 PAT	-	44	0	5	-
G21 CAB	-	49	0	5	-
G21 CAU	-	49	0	5	-

Identificação Camundongos	PCR camundongo	Nº da Galinha	Bradizoítos* (Lâminas positivas)	Título Mat Galinha	Mat Camundongo (1:25)
G21 DOR	-	49	0	5	-
G21 BAR	-	49	0	5	-
G21 PAT d	-	49	0	5	-
G21 PAT e	-	49	0	5	+
G22 CAB	-	36	0	5	-
G22 CAU	-	36	0	5	-
G22 DOR	-	36	0	5	-
G22 BAR	-	36	0	5	-
G23 CAB	-	18	0	5	-
G23 CAU	-	18	0	5	-
G23 DOR	-	18	0	5	-
G23 BAR	-	18	0	5	-
G23 PAT d	-	18	0	5	-
G23 PAT e	-	18	0	5	-
G24 CAB	-	21	0	5	-
G24 CAU	-	21	0	5	-
G24 DOR	-	21	0	5	-
G24 BAR	-	21	0	5	-
G24 PAT d	-	21	0	5	-
G24 PAT e	-	21	0	5	-
G25 CAB	-	5	0	5	-
G25 CAU	-	5	0	5	-
G25 DOR	-	5	0	5	-
G25 BAR	-	5	0	5	-

Identificação Camundongos	PCR camundongo	Nº da Galinha	Bradizoítos* (Lâminas positivas)	Título Mat Galinha	Mat Camundongo (1:25)
G25 PAT d	-	5	0	5	-
G25 PAT e	-	5	0	5	-
G26 CAB	-	20	0	10	-
G26 CAU	-	20	0	10	-
G26 DOR	-	20	0	10	-
G26 BAR	-	20	0	10	-
G26 PAT d	-	20	0	10	-
G26 PAT e	-	20	0	10	-
G27 CAB	-	34	0	10	-
G27 CAU	-	34	0	10	-
G27 DOR	-	34	0	10	-
G27 BAR	-	34	0	10	-
G27 PAT d	-	34	0	10	-
G27 PAT e	-	34	0	10	-

* Foram visualizadas duas lâminas com *imprints* de cérebro por animal. Considerou-se como camundongo positivo para achado de cisto(s) no cérebro quando em uma ou duas lâminas foi encontrado cisto(s) de *T. gondii*.

APÊNDICE C - Sumário de genótipos de *T. gondii* através de análise PCR-RFLP obtidos de galinhas do Brasil. Adaptado de Dubey et al., (2003, 2007, 2008);

Genótipo	Nº isolados/ genótipo	Identificação dos isolados
#01	7	TgCkBr119,120,122,129,135,137,140
#02	2	TgCkBr48,88
#03	2	TgCkBr96
#04	3	TgCkBr75, 76, 92
#05	9	TgCkBr81,147,148,151,154,160, 162, 163
#06	5	TgCkBr41,42,49, 60, 62
#07	2	TgCkBr46
#08	1	TgCkBr178
#09	8	TgCkBr38,27,44,51,65,66,78,80
#10	1	TgCkBr45
#11	1	TgCkBr177
#12	1	TgCkBr114
#13	2	TgCkBr171, 172
#14	1	TgCkBr173
#15	3	TgCkBr136, 138, 139
#16	13	TgCkBr123, 124, 55, 79, 86,87, 10, 98, 101, 102, 104, 144
#17	2	TgCkBr40, 47
#18	2	RH88 ; TgCkBr146
#19	1	TgCkBr141
#20	1	TgCkBr54
#21	10	TgCkBr165,167,170,174,176,179, 180, 183, 184,185
#22	1	TgCkBr169
#23	4	TgCkBr115, 142, 145
#24	4	TgCkBr59, 30, 34, 67
#25	1	TgCkBr186
#26	1	TgCkBr156
#27	1	TgCkBr74
#28	4	TgCkBr82, 90, 153
#29	1	TgCkBr130
#30	10	TgCkBr11,7,17,131,132,133,134, 194,195
#31	1	TgCkBr8
#32	4	TgCkBr111, 112, 182, 196
#33	1	TgCkBr181
#34	6	CTG; TgCkBr31, 56, 158, 161,164
#35	4	TgCkBr149, 150, 152, 157
#36	1	TgCkBr113

Genótipo	Nº isolados/ genótipo	Identificação dos isolados
#37	1	TgCkBr110
#38	1	TgCkBr166
#39	2	TgCkBr26, 69
#40	3	TgCkBr126, 127, 117
#41	2	TgCkBr107, 108
#42	3	TgCkBr99, 100
#43	2	TgCkBr93, 94
#44	6	TgCkBr28, 33, 50, 52, 58
#45	2	TgCkBr95
#46	2	TgCkBr155, 159
#47	1	TgCkBr109
#48	1	TgCkBr16
#49	2	TgCkBr13, 23
#50	4	TgCkBr57,64, 97
#51	0	<i>TgCkBr116: excluída por conter "missing characters"</i>
#52	1	TgCkBr168
#53	1	TgCkBr143
#54	1	TgCkBr37
#55	1	TgCkBr61
#56	2	TgCkBr19, 24
#57	4	TgCkBr36, 32, 84, 85
#58	2	TgCkBr89
#59	6	TgCkBr188,189,190,191,192,193
#60	1	TgCkBr197
#61	1	Cougar
#62	1	PTG

RH88: arquétipo clonal Tipo I

CTG: arquétipo clonal Tipo II

PTG: arquétipo clonal Tipo III

Cougar: referência

#16: genótipo clonal BrI

#50: genótipo clonal BrII

#30: genótipo clonal BrIII

#05: genótipo clonal BrIV

Reflexão final:

"Morre lentamente quem não viaja, quem não lê, quem não ouve música e quem não acha graça de si mesmo." (Martha Medeiros).