



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: **Hanstter Hallison Alves Rezende**

Título do trabalho: **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii*
NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor²

Ciente e de acordo:



Assinatura da orientadora²

Data: 17 / 01 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão atualizada em setembro de 2017.

² A assinatura deve ser escaneada.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

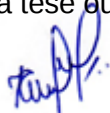
2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Hanstter Hallison Alves Rezende

Título do trabalho: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL

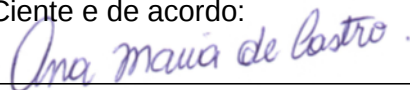
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹
Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do autor²

Ciente e de acordo:



Assinatura da orientadora²

Data: 15/06/2022

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública, na área de concentração em Parasitologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria de Castro
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marina Clare Vinaud

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

HALLISON ALVES REZENDE, HANSTTER
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLAÇOS DE *Toxoplasma*
gondii NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL
[manuscrito] / HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE. - 2017.
150 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. ANA MARIA DE CASTRO; co-orientadora
Dra. MARINA CLARE VINAUD.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. toxoplasmose. 2. galinhas caipiras. 3. gatos errantes. 4.
genotipagem. 5. diversidade genética. I. MARIA DE CASTRO, ANA ,
orient. II. Título.

CDU 616-022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6365 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE - Aos doze dias do mês de janeiro do ano de 2018 (12/01/2018), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ANA MARIA DE CASTRO, ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES, THIAGO LOPES ROCHA, CLEVER GOMES CARDOSO e DANILO FIGUEIREDO SOAVE, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL"** em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **PARASITOLOGIA**, de autoria de **HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE** discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. ANA MARIA DE CASTRO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado ou Reprovado**:

Banca Examinadora

Dra. Ana Maria de Castro

Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes

Dr. Thiago Lopes Rocha

Dr. Cléver Gomes Cardoso

Dr. Danilo Figueiredo Soave

Aprovado / Reprovado

APROVADO

APROVADO

Aprovado

APROVADO

Aprovado

Habilitado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato **Habilitado** (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Dra. Ana Maria de Castro (IPTSP/UFG)

Ana Maria de Castro

Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes (IPTSP/UFG)

Éverton Kort Kamp Fernandes

Dr. Thiago Lopes Rocha (IPTSP/UFG)

Thiago Lopes Rocha

Dr. Cléver Gomes Cardoso (ICB/UFG)

Cléver Gomes Cardoso

Dr. Danilo Figueiredo Soave (UNIRV/Goiânia)

Daniilo Figueiredo Soave

Secretária da Pós-Graduação:

Kariny Vieira Soares e Silva

**BANCA EXAMINADORA DO EXAME DE DEFESA DE
DOUTORADO**

Aluno: Me. Hanstter Hallison Alves Rezende

Orientadora: Dr^a Ana Maria de Castro

Co-orientadora: Dr^a Marina Clare Vinaud

Membros:

- 1. Dr^a. Ana Maria de Castro – IPTSP/UFG (Presidente)**
- 2. Dr. Everton Kort Kamp Fernandes – IPTSP/UFG (Memória)**
- 3. Dr. Thiago Lopes Rocha – IPTSP/UFG**
- 4. Dr. Clever Gomes Cardoso– ICB/UFG**
- 5. Dr. Danilo Figueiredo Soave – UNIRV/Goianésia**

Data: 12/01/2018

*Aos animais de experimentação que
contribuíram com suas vidas para que essa
pesquisa fosse possível.*

*“O que vale da vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher”*
Cora coralina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir realizar o grande sonho de concluir o doutorado.

Agradeço a minha eterna orientadora Dra. Ana Maria de Castro por sempre acreditar em mim e por fazer o diferencial na minha vida, e me mostrar que a educação transforma.

A toda minha família em especial minha mãe Sirlene Alves dos Reis, que mesmo em todas as dificuldades sempre me motivou. Aos familiares Grackelly, Murilo, Lindomar, Patricia, Lindolfo, Aledícia, Lucirene, Luma, Guilherme e Débora.

A co-orientadora Dra. Marina Clare Vinaud, que contribui para o estudo fosse realizado, aos professores da banca de qualificação Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes, Dra. Kátia Karina Verolli de O Moura e Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes pela grande contribuição no desenvolvimento desta tese.

Aos servidores do IPTSP em especial José Clementino (Zezinho), Jéssica Yonara, Kariny Vieira, Marco Vitor, Iraci Maria, Daniel Goulart e Fernanda Siqueira.

Aos colegas do LAERPH, Juliana Boaventura, Jaqueline Ataíde, Heloísa Storchilo, Taynara Gomes, Antônio Junior, Jade Melo, Nayana Ferreira, Luciana Damascena, Guaraciara Picanço e Francesca Chapadense.

A FAPEG pela concessão da bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ix
SUMÁRIO	x
FIGURAS	xii
QUADROS E TABELAS	xiv
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Histórico da Toxoplasmose	4
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> : Etiologia, classificação e ciclo de vida	5
2.3. Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em humanos	7
2.3.1. Infecção adquirida	7
2.3.2. Infecção congênita	8
2.4. Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> nos felídeos – O papel dos gatos	9
2.5. Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> nas galinhas	12
2.6. Diagnóstico laboratorial da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos e galinhas	14
2.6.1. Diagnóstico sorológico	14
2.6.2. Diagnóstico parasitológico	14
2.6.3. Isolamento do parasito pelo bioensaio	15
2.6.4. Técnicas moleculares	15
2.7. Diversidade genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
2.8. Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (RFLP-PCR)	17
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo Geral	21
4.2. Objetivos Específicos	21
5. MÉTODOS	22
5.1. Delineamento Experimental	22
5.2. Considerações éticas	23
5.3. Descrições dos grupos do estudo	23
5.4. Eutanásia dos animais e coletas de amostras biológicas	25
5.4.1 Gatos errantes	25
5.4.2 Galinhas caipiras	26
5.5. Realização da Hemaglutinação Indireta (HAI)	26

5.6	Processamento das amostras de tecido.....	27
5.7	Bioensaio em camundongos.....	27
5.7.1	Acompanhamento dos animais	27
5.8	Morfometria dos isolados obtidos.....	30
5.9	Análise de virulência dos isolados	30
5.10	Extração de DNA	31
5.11	Detecção do <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR.....	31
5.12	Comparação entre a HAI e a técnica de PCR.....	32
5.13	Genotipagem dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos por Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (RFLP-PCR).....	33
6.	RESULTADOS	36
7.	DISCUSSÃO/CONSIDERAÇÕES	114
8.	CONCLUSÕES FINAIS	117
	REFERÊNCIAS GERAIS	118
	Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Uso de animais (CEUA-UFG) 024/2016	139
	Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética Humano	143
	Anexo 3 - Artigo produto do doutorado	147
	Anexo 4 - Artigo publicado durante o curso de doutorado.....	153
	Anexo 5 - Artigo em colaboração durante o curso de doutorado	154
	Anexo 6 - Artigo em colaboração durante o curso de doutorado	164

FIGURAS

TESE

Figura 1. Roedor <i>Ctenodactyllus gundi</i> , primeiro hospedeiro onde foi isolado <i>Toxoplasma gondii</i>	04
Figura 2. Formas Evolutivas de <i>Toxoplasma gondii</i> . A) Taquizoítos (seta) obtidos em lavado peritoneal de camundongos BALB/c, corados por Panótico. B) Cisto no cérebro de um camundongo infectado com cepa ME-49, a fresco entre lâmina e lamínula. C) Oocisto esporulado em fezes, a fresco, régua micrométrica na escala de 10µm.....	06
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	07
Figura 4. Delinamento experimental realizado nesta pesquisa.....	22
Figura 5. Gato errante capturado pelo Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia, isolado em gaiola em observação.....	24
Figura 6. Gatos domésticos em propriedades rurais, bem como o convívio entre o gato e a galinha caipira.....	25
Figura 7. (A) camundongo com sinais clínicos de toxoplasmose aguda, incluindo dificuldade respiratória e pelos arrepiados; (B) camundongo apresentando diarreia.....	28
Figura 8. (A) lavado peritoneal turvo; (B) microscopia de lavado peritoneal a fresco, apresentando taquizoítos.....	29
Figura 9. Cisto (Seta) contendo bradizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> em cérebro de camundongo bioensaiado a fresco entre lâmina e lamínula.....	29

ARTIGO 1

Figura 1: Localidades dos municípios da Região Metropolitana de Goiânia, no estado de Goiás, Região Centro-Oeste, Brasil.....	42
--	-----------

Figura 2: Mortalidade de camundongos BALB/c inoculados via intraperitoneal com diferentes concentrações de taquizoítos dos isolados virulentos: TgCkBrGO05, TgCkBrGO06, TgCkBrGO10, TgCkBrGO13 e cepa padrão RH88.....	48
Figura 3: Mortalidade de camundongos BALB/c inoculados via intraperitoneal com diferentes concentrações de taquizoítos dos isolados classificados como virulentos intermediários TgCkBrGO02, TgCkBrGO04 e TgCkBrGO09.....	49
Figura 4: Árvore filogenética dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de galinhas caipiras naturalmente infectadas na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás. Foram incluídos os genótipos de referência (GT1 = tipo I, PTG = tipo II, CTG = tipo III, além dos genótipos atípicos MAS, TgCatBr5, TgCatBr64, TgCgCa1 e TgRsCr1).....	50

QUADROS E TABELAS

TESE

Quadro 1. Panorama da frequência de gatos soropositivos em diversas regiões do Brasil.....	11
Quadro 2. Panorama da frequência de galinhas caipiras soropositivas em diversas regiões do Brasil.....	13
Tabela 1. Localização das propriedades que participaram do experimento e número de galinhas coletados.....	24
Tabela 2. Escala de concordância do índice <i>kappa</i>	32
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para RFLP-PCR.....	34
Tabela 4. Códigos binários dos genótipos para construção da árvore filogenética pelo programa <i>SliptsTree</i>	35
Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Uso de animais (CEUA-UFG) 024/2016.....	139
Anexo 2. Parecer do Comitê de Humano.....	143
Anexo 3. Artigo produto do doutorado.....	147
Anexo 4. Artigo publicado durante o curso de doutorado.....	153
Anexo 5. Artigo em colaboração durante o curso de doutorado.....	154
Anexo 6. Artigo em colaboração durante o curso de doutorado.....	164

ARTIGO 1

Tabela 1. Razão das diferenças do número de galinhas positivas e negativas nos testes de Hemaglutinação Indireta (HAI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	47
Tabela 2. Análise morfométrica dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> em comparação com a cepa padrão RH88, realizada pelo programa ImageJ®.....	48
Tabela 3. Caracterização genotípica dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos de galinhas caipiras naturalmente infectadas na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás.....	50

ARTIGO 2

Tabela 1. Resultado de análise sorológica para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> pelo teste de Hemaglutinação Indireta (HAI) em gatos errantes em Goiânia, Goiás de 2016 a 2017.....	88
---	----

Tabela 2: Comparação dos resultados do título de anticorpos detectado pela técnica de Hemaglutinação Indireta-HAI em amostras de soro de gatos errantes em Goiânia, Goiás, com os resultados obtidos pelo pool de tecidos pela Reação em Cadeia da Polimerase-PCR.....

Tabela 3. Razão das diferenças do número de gatos positivos e negativos nos testes de Hemaglutinação Indireta (HAI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....**64**

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
COCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação
dATP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Adenina
dCTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Citosina
dGTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Guanina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dTTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Timina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzimaimunoensaio
FAPEG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
g	Gramas
HAI	Hemaglutinação
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IP	Intraperitoneal
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
K	Índice <i>Kappa</i>
Kg	Quilogramas
LAERPH	Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro
MAT	Teste de Aglutinação Modificado
Mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MI	Mililitro
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
RFLP	Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos
RMG	Região Metropolitana de Goiânia
SC	Subcutânea
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Aquirida
U	Unidade
UFG	Universidade Federal de Goiás
VO	Via oral

RESUMO

O protozoário *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, possui como hospedeiro definitivo os gatos (*Felis catus*) e outros felídeos. Nas cidades, os gatos errantes são os responsáveis pela disseminação do parasito no meio ambiente, por liberarem oocistos em suas fezes, que são uma das formas infectantes para o homem e outros animais. As galinhas caipiras (*Gallus gallus*) por estarem em contato com o ambiente e se alimentarem diretamente do solo, são importantes indicadores da contaminação do ambiente por *T. gondii*. O conhecimento da prevalência, características biológicas e genéticas de *T. gondii*, é necessário para compreensão da complexa relação parasito-hospedeiro. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a concordância das técnicas laboratoriais utilizadas, a prevalência, a biologia e a epidemiologia molecular de *T. gondii* isolados de gatos errantes e galinhas caipiras na região metropolitana de Goiânia, para melhor compreensão da infecção. Este é o primeiro estudo realizado de caracterização genética e biológica de *T. gondii* no estado de Goiás. Compuseram o estudo 24 gatos errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses em Goiânia e 50 galinhas caipiras da Região Metropolitana de Goiânia, Goiás. Foi realizada a técnica de hemaglutinação indireta (HAI), como triagem dos animais positivos, sendo 87,4 % dos gatos e 96 % das galinhas caipiras ~~foram~~ soropositivas para *T. gondii*. Para realização do bioensaio foram utilizados o cérebro e coração dos gatos e galinhas obtidos após a eutanásia dos animais. Após a digestão péptica o homogenado dos tecidos, foi inoculado via intraperitoneal em grupos de três camundongos da linhagem Swiss, estes, foram avaliados diariamente para observação de sinais de toxoplasmose aguda. Os camundongos assintomáticos foram eutanasiados em 60 dias, sendo realizada a sorologia por Imunofluorescência indireta para constatar soroconversão, e fragmentos do cérebro foram observados ao microscópio para visualização de cistos. Parte do homogenado foi submetido a extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR), em que 75 % dos gatos e 64 % das galinhas apresentaram a PCR positiva. Ao analisar a correlação entre a técnica de HAI com a PCR os resultados obtidos em ambos modelos animais a concordância foi fraca. Não foram obtidos isolados dos gatos, mas das galinhas foram obtidos um total de 15 isolados, oito apresentavam taquizoítos (toxoplasmose aguda) e sete cistos cerebrais (toxoplasmose crônica). Após a extração de DNA dos isolados, realizou-se a técnica de Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (RFLP-PCR) utilizando os marcadores SAG1, 5'-3' SAG2, altSAG, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Foi possível definir o genótipo de

nove isolados; sete correspondem ao genótipo #65 de acordo com o ToxoDB e dois isolados não descritos. A análise demonstrou alta diversidade genética e variabilidade genética. Além da análise genética, foram realizados testes de virulência na avaliação da mortalidade de camundongos em sete isolados que apresentaram taquizoítos; mesmo sendo do mesmo genótipo, quatro foram definidos como alta virulência e três com virulência intermediária. Ao se avaliar a morfometria dos isolados, todos apresentaram diferença em uma das variáveis avaliadas, seja no comprimento, largura ou distância do núcleo-complexo apical. As diferenças fenotípicas observadas nos isolados, mesmo sendo do mesmo genótipo, demonstra a necessidade na continuidade da caracterização genética do parasito, utilizando outros marcadores que poderiam se relacionar com o fenótipo do isolado. Estes dados demonstraram a importância de estudos de epidemiologia molecular na região metropolitana de Goiânia, que apresenta elevadas taxas de soroprevalência nos hospedeiros.

Palavras-chave: Toxoplasmose, galinhas caipiras, gatos errantes, genotipagem, diversidade genética.

ABSTRACT

The protozoan *Toxoplasma gondii* is the etiological agent of toxoplasmosis and its definitive hosts are domestic cats (*Felis catus*) and other wild felids. Within the cities, stray cats are responsible for the dissemination of the parasite in the environment as they release oocysts which are the infective forms for humans and other animals. Backyard chickens (*Gallus gallus*) are in constant contact with the environment and feed directly from the soil. Therefore they are important indicators of environmental conditions. The knowledge regarding prevalence, biological and genetic characteristics of *T. gondii* are of utmost importance for the comprehension of the complex host-parasite relationship. Thus the aim of this study was to evaluate the concordance of laboratory techniques used to detect the parasite; to determine the prevalence, biology and molecular epidemiology of *T. gondii* isolated from stray cats and backyard chickens from the metropolitan region of Goiania, in order to better comprehend the infection. This is the first performed study to determine the genetic and biologic characterization of *T. gondii* in the state of Goias. This study used 24 stray cats captured by the Center for the Zoonosis Control in Goiania and 50 backyard chickens from the Metropolitan Region of Goiania, Goias. The serologic triage was performed by IHA and showed positivity of 87.4% (21/24) cats and 96% (48/50) backyard chickens for *T. gondii*. The bioassay was performed using the brain and hearts of the cats and chickens obtained after euthanasia of the animals. After the peptic digestion the homogenate tissues was intraperitoneally inoculated in groups of three Swiss mice each which were daily observed in order to detect signs of acute toxoplasmosis. The asymptomatic mice were euthanized after 60 days followed by serologic analysis through indirect immunofluorescence. Fragments of brain from these animals were observed under optic microscopy in order to visualize tissue cysts. Part of the homogenate was submitted to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) in which 75% (18/24) cats and 64% (32/50) backyard chickens were positive. The correlation between IHA and PCR from both animals was considered weak. It was not possible to obtain isolate strains from cats. From the chickens it was possible to obtain 15 isolates strains from which 8 presented tachyzoites (acute toxoplasmosis) and 7 presented brain tissues (chronic toxoplasmosis). After the DNA extraction from the isolates the RFLP-PCR was performed using the following primers SAG1, 5'-3' SAG2, altSAG, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico and CS3. It was possible to define the genotype from 9 isolates. According to ToxoDB seven isolates corresponded to genotype #65 and two isolates have not been

described previously. The genetic analysis showed high diversity and variability. The virulence essays showed that the mortality rate in mice in seven isolates that presented tachyzoites, from the same genotype, detected high virulence in 4 isolates and intermediary virulence in 3. The morphometry analysis of the tachyzoites of these isolates showed statistical difference in at least one of the analyzed variables such as length or nuclei-apical complex distance. These phenotypic differences in isolates from the same genotype show the need to the continuity of the genetic characterization of the parasite using other primers which could be related to the isolated phenotype. The study demonstrated the importance of knowledge about the molecular epidemiology of *T. gondii* in the metropolitan region of Goiânia, which presents high rates of seroprevalence in hosts.

Key words: Toxoplasmosis, backyard chickens, stray cats, bioassay, genotype, , genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e sub-família Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma*, apresentando apenas uma espécie válida, *T. gondii* (LEVINE et al., 1980; DUBEY et al., 2002).

O protozoário, em seu ciclo biológico, possui como hospedeiro definitivo os felídeos e como hospedeiros intermediários os outros animais, como mamíferos e aves (SU et al., 2010; DUBEY et al., 2013). A principal forma de transmissão do parasito é pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados com oocistos esporulados e carnes malcozidas com cistos teciduais viáveis. Portanto, a infecção por *T. gondii* depende de fatores alimentares e comportamentais (DUBEY; LAPPIN, 2006; ROSSO et al., 2008; MONCADA; MONTOYA, 2012; AVELINO et al., 2014).

Normalmente os indivíduos infectados por *T. gondii* são assintomáticos, porém, a toxoplasmose pode se manifestar clinicamente em crianças infectadas congenitamente e em indivíduos imunocomprometidos (DUBEY; JONES, 2008; MURAT et al., 2013). Indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) podem reativar a doença e evoluírem para um quadro de encefalite toxoplásmica (JONES et al., 2014). Esta infecção também está relacionada com distúrbios psiquiátricos, como a esquizofrenia, depressão e ansiedade (HENRIQUEZ et al., 2009).

Nos últimos anos, estudos sobre *T. gondii* foram desenvolvidos pelo Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro (LAERPH) no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) na cidade de Goiânia-GO, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Maria de Castro. Tais estudos demonstraram que 34,2 % das gestantes em Goiânia estão sob risco de adquirirem a infecção com uma taxa de soroconversão de 8,6 % (AVELINO et al., 2003). SILVA et al. 2013, estudando mulheres com gravidez de risco para toxoplasmose oriundas de maternidades de Goiânia, conseguiu detectar o parasito em 33,8 % de suas amostras. Dando continuidade aos estudos, COSTA (2007) demonstrou a eficácia do tratamento sobre o parasitismo por *T. gondii*, pois de 32

amostras de recém-nascidos de mulheres que receberam o tratamento profilático, durante a gestação, em nenhum foi possível detectar o parasito.

AVELAR (2013) demonstrou uma prevalência de 51,85 % de mães cronicamente infectadas para toxoplasmose em duas maternidades públicas em Goiânia-GO. Os trabalhos acima citados, demonstraram claramente a alta prevalência da toxoplasmose nas populações estudadas, ressaltando que todas amostras analisadas eram de pacientes provenientes do Estado de Goiás, todos estes dados levaram ao questionamento sobre a epidemiologia molecular das cepas de *T. gondii* que circulam em Goiânia, Goiás, e como seria o envolvimento dos animais na transmissão do parasito.

Assim, uma nova linha de pesquisa começou a ser desenvolvida pelo LAERPH. REZENDE et al. (2015), demonstraram que 13,6 % dos gatos errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia, no período de 2012 a 2013, estavam liberando oocistos em suas fezes; enquanto 64 % dos gatos analisados no mesmo período eram soropositivos para *T. gondii*. A partir destes dados se tornou prioridade o isolamento de cepas de *T. gondii* a partir de material biológico de humano, gatos errantes, domiciliados e galinhas caipiras.

O gato errante foi escolhido pelo fato de ser o hospedeiro definitivo. Vale lembrar que os felídeos são os perpetuadores do parasito no meio ambiente, por eliminarem milhões de oocistos em suas fezes. Os gatos, principalmente gatos errantes defecam em vias públicas sendo considerados os mais importantes neste contexto (BROWN et al., 2003; REZENDE et al., 2015a; LIMA, 2016).

Já as galinhas (*Gallus gallus*) são consideradas indicadoras de contaminação ambiental pelo fato de se alimentarem diretamente no solo, estando assim constantemente expostas à oocistos (DUBEY et al., 2003a; ZHU et al., 2008). As galinhas caipiras podem servir como fonte de infecção para humanos, e já foi demonstrada a associação entre a alimentação e manipulação da carne desses animais, principalmente nas propriedades rurais onde são criadas de forma extensiva (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2009).

O conhecimento das características biológicas e genéticas de *T. gondii* é necessário para compreensão da complexa relação parasito-hospedeiro. A virulência de isolados de *T. gondii* pode ser analisada em animais experimentais, como os camundongos. A variação do comportamento biológico varia de acordo com as características genéticas do parasito:

alguns genótipos são letais para qualquer linhagem de camundongo, enquanto outros genótipos podem apenas estabelecer infecção crônica nesses animais. A determinação da virulência do isolado em camundongos pode prever a infecção em humanos (SARAF et al., 2017).

A compreensão da diversidade genética do *T. gondii* é importante para determinar a epidemiologia molecular do parasito, já que alterações genéticas podem ser relevantes para se entender a transmissão, imunogenicidade e patogenicidade (SIBLEY et al., 2009).

Nesse contexto, o presente estudo avaliou, soroprevalência, concordância entre técnicas laboratoriais, virulência, características morfométricas e a epidemiologia molecular de *T. gondii* isolados a partir de gatos errantes e galinhas caipiras na região metropolitana de Goiânia. Este é o primeiro estudo da avaliação genética de *T. gondii* isolados na região metropolitana de Goiânia, estado de Goiás.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico da Toxoplasmose

Toxoplasma gondii foi descrito por Alfonso Splendore, num coelho de laboratório que faleceu com paralisia em 1908 em São Paulo, classificando o parasito como uma espécie do gênero *Leishmania* (SPLENDORE, 1908; DUBEY, 2008). No mesmo ano na África, Charles Nicolle e Louis Manceaux identificaram estágios do parasito no roedor *Ctenodactylus gundi* (Figura 1); na ocasião estes pesquisadores denominaram de *Leishmania gondi*, logo mais em 1909 perceberam que haviam descoberto um novo organismo, e o denominaram de *Toxoplasma gondii*, sendo *Toxoplasma* derivado da sua forma em crescente (toxon= arco e plasma= forma, em grego) e *gondii* deriva do roedor onde foi identificado (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; DUBEY, 2008).



Figura 1: Roedor *Ctenodactylus gundi*, primeiro hospedeiro onde foi isolado *Toxoplasma gondii*. Disponível em: <https://www.zoochat.com/community/media/gundi-ctenodactylus-gundi.254676/>

Embora *T. gondii* seja o parasito com a maior distribuição no planeta e com a maior gama de hospedeiros susceptíveis, Sabin em 1939 concluiu que existe apenas uma espécie no gênero *Toxoplasma*, baseado em estudos de semelhanças biológicas e imunológicas (SABIN, 1939; DUBEY, 2008).

O fato de alguns hospedeiros apresentarem sinais clínicos, enquanto na maioria a infecção cursa de forma assintomática ainda precisa ser esclarecido. A América do Sul é considerada um *hotspot* para a diversidade genética do parasito. Dessa forma, acredita-se

que os hospedeiros não são totalmente adaptados às cepas do parasito, por esse motivo apresentam clínica mais severa (DUBEY, 2008; RUDZINSKI et al., 2016; BERTRANPETIT et al., 2017).

2.2. *Toxoplasma gondii*: Etiologia, classificação e ciclo de vida

T. gondii apresenta três formas infectantes distintas: taquizoíto, bradizoíto (contido em cistos teciduais) e esporozoíto (em oocistos). Tanto o hospedeiro intermediário, quanto o definitivo são suscetíveis aos três estágios, podendo adquirir a infecção pelas vias horizontal e vertical. Por via horizontal, a transmissão pode ocorrer através da ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente; pela ingestão de cistos teciduais em carnes cruas e/ou malcozidas de hospedeiros intermediários; ingestão de alimentos embutidos contaminados; infecção por transfusão sanguínea; transplante de órgãos; também há evidências da transmissão sexual de taquizoítos já demonstrada em camundongos. Por via vertical pela transmissão transplacentária de taquizoítos. Dessa forma, o parasito pode ser transmitido entre hospedeiros definitivos e intermediários, não necessitando da presença dos dois tipos de hospedeiros para estabelecer o ciclo (SANTOS; AMARAL; REBOUÇAS, M.M. DRUMOND, 1983; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000a; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2008; SÁ, 2011).

Os taquizoítos (Figura 2-A) são uma forma de multiplicação rápida, sendo encontrados dentro do vacúolo parasitóforo de vários tipos celulares; medem 2 µm x 6 µm de tamanho, e possuem formato de lua crescente. Multiplicam-se assexuadamente por endodiogênias repetidas até a ruptura da célula, nesta etapa esta forma pode estar presente nos líquidos orgânicos, esse processo leva a uma intensa reação inflamatória e destruição tecidual, causando as manifestações clínicas da toxoplasmose aguda. Após um número desconhecido de divisões passam para o estágio de bradizoítos; dentro dos cistos tissulares, a diferenciação ocorre por fatores endógenos e exógenos do hospedeiro, como sua imunidade, pH e temperatura (DUBEY et al., 2004c; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

Os bradizoítos, medem de 1,5 µm a 7 µm de tamanho, ficam retidos em cistos tissulares (Figura 2-B) que variam de 5 µm a 70 µm, possuindo uma membrana dupla elástica, contendo uma quantidade variável de bradizoítos. Os cistos são as formas de resistência do parasito, intactos e inofensivos podem resistir ao longo da vida do

hospedeiro. Os cistos são mais frequentes nos tecidos musculares e neural, incluindo o cérebro, olhos, músculos cardíaco e esquelético (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; TAYLOR et al., 2006).

Quando ingerido por um gato, a parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado e então são liberados os bradizoítos. Alguns penetram na lâmina basal do intestino e se multiplicam como taquizoítos e em poucas horas se disseminam pelos tecidos extra-intestinais. Outros bradizoítos penetram nas células do intestino e iniciam-se as gerações assexuadas (esquizontes). Os merozoítos, liberados dos esquizontes, formam os gametas masculinos e femininos. Após a fertilização formam-se as paredes dos oocistos em volta dos gametas e quando os oocistos se formam são liberados na luz intestinal através da ruptura das células do epitélio intestinal (DUBEY et al., 2004c).

Os oocistos (Figura 2-C) são esféricos, com diâmetro de 12 μm e dupla membrana, sendo esta a forma de resistência ambiental. São eliminados não esporulados para o meio ambiente pelo gato doméstico e felídeos silvestres, e dentro de cinco dias ocorre o processo de esporulação, dependendo de condições de aeração e temperatura. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos elipsoides e dentro de cada um destes existem quatro esporozoítas, que são as formas infectantes, medindo 2 μm de largura por 6 μm de comprimento. Um único gato é capaz de eliminar em uma defecação 10 milhões de oocistos. Oocistos não esporulados podem sobreviver pelo menos três meses no meio ambiente e conservar sua capacidade de infectar (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; WEBSTER, 2010).

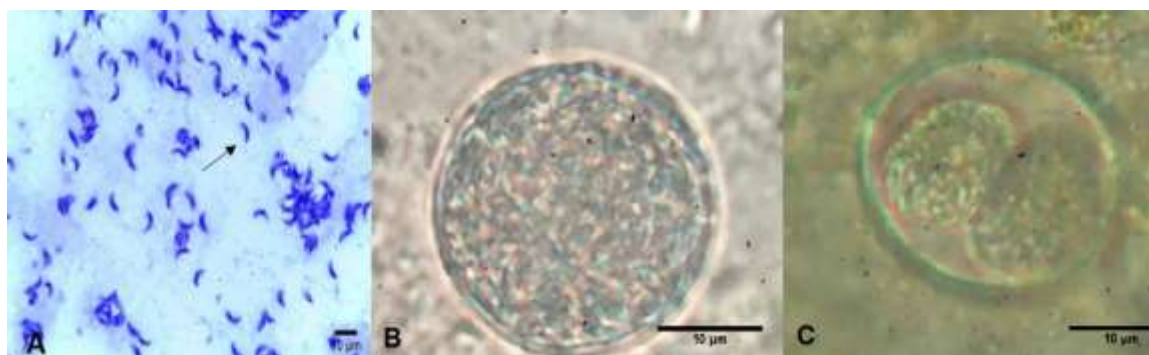


Figura 2. Formas Evolutivas de *Toxoplasma gondii*. **A)** Taquizoítos (seta) obtidos em lavado peritoneal de camundongos BALB/c, corados por Panótico. **B)** Cisto no cérebro de um camundongo infectado com cepa ME-49, a fresco entre lâmina e lamínula. **C)** Oocisto esporulado em fezes, a fresco, régua micrométrica na escala de 10 μm . Fonte: Arquivo do autor.

O ciclo de *T. gondii* é heteroxeno (Figura 3), e possui duas fases distintas: a fase assexuada ocorre nos tecidos de diversos hospedeiros intermediários incluindo o homem. A fase sexuada ocorre somente nos felídeos, que são os hospedeiros definitivos. Estes animais se infectam naturalmente pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos presentes em solo e como são carnívoros, pode ocorrer à infecção principalmente pela ingestão de roedores com cistos tissulares, além de carcaças e vísceras fornecidos pelo homem como forma de alimento (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

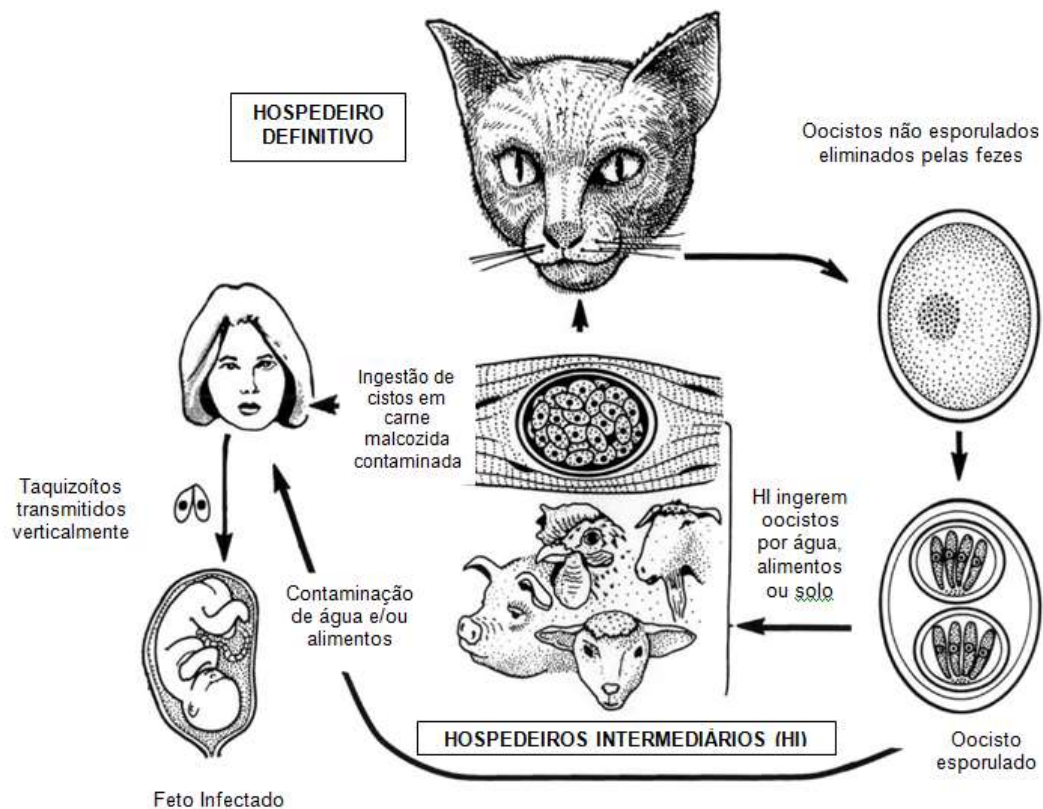


Figura 3: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005)

2.3. Infecção por *Toxoplasma gondii* em humanos

2.3.1. Infecção adquirida

A infecção por *T. gondii* de forma adquirida em pacientes imunocompetentes geralmente cursa de forma assintomática em até 90% dos pacientes (HILL; DUBEY, 2002; JONES et al., 2014). Mas quando sintomática, pode apresentar-se com enfartamento de

linfonodos sem dor, hepatoesplenomegalia e erupção cutânea (MORON; CARVALHO; SANTANA, 2003). Como a forma adquirida está diretamente relacionada a hábitos alimentares, principalmente a ingestão de carne malcozida e vegetais crus contaminados; geralmente o parasito *T. gondii* não é adquirido nos primeiros meses de vida (MONCADA; MONTOYA, 2012; AVELINO et al., 2014).

2.3.2. Infecção congênita

No Brasil, a soroprevalência para toxoplasmose em gestantes cronicamente infectadas varia de 50 a 70%. Na região Centro Oeste no estado do Mato Grosso do Sul, a prevalência foi de 91,6%; em Goiás a prevalência é de 68,3% (SARTORI et al., 2011). No Nordeste no estado de Maranhão chega a 77,9% (CÂMARA; SILVA; CASTRO, 2015). Na região Norte no estado de Tocantins chega a 68,7% (GONTIJO-SILVA; VINAUD; CASTRO, 2015). Na região Sudeste no estado de São Paulo a prevalência foi de 64,4% (MATTOS et al., 2011), na região Sul no estado do Paraná a prevalência foi de 59%.

A infecção na gestante geralmente é assintomática, ocorrendo uma rápida parasitemia que pode causar lesões focais na placenta (AVELINO et al., 2003). O parasito alcança a placenta predominantemente por via hematogênica ou via ascendente, através do canal endocervical (YADAV; MAITY; SAHA, 2014). A primo-infecção durante a gestação é a forma mais importante da toxoplasmose, pois pode resultar em sequelas graves no concepto, devido a transmissão congênita (THIÉBAUT et al., 2007). Mães cronicamente infectadas podem reativar a doença durante a gestação, pela redução na resposta celular e infectar seu feto (ANDRADE et al., 2009; AVELAR et al., 2015).

A toxoplasmose congênita pode determinar a morte do concepto ou causar alterações que agravam o prognóstico neonatal como: prematuridade; retardo de crescimento intrauterino; anomalias do desenvolvimento; malformações congênitas e doença generalizada; ou criança normal ao nascer que pode apresentar sequelas futuras de infecção crônica persistente (THIÉBAUT et al., 2007; PASCHALE et al., 2010; YADAV; MAITY; SAHA, 2014).

As crianças cronicamente infectadas podem apresentar um ou todos os sinais clínicos conhecidos como à clássica Tétrade de Sabin, apresentando alterações oculares, como a coriorretinite, perturbações neurológicas, calcificações cerebrais, alterações no volume

craniano, microcefalia ou hidrocefalia. Entretanto podem surgir outras alterações como a hepatoesplenomegalia, convulsões, paralisias, diminuição do déficit cognitivo, linfadenopatia e erupções cutâneas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). No Brasil, as sequelas mais comuns são lesões oculares, diminuição da audição e lesões neurológicas (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009).

2.4. Infecção por *Toxoplasma gondii* nos felídeos – O papel dos gatos

Todos os felídeos são susceptíveis à infecção, os felídeos têm importância na transmissão de *T. gondii* por ser um hospedeiro definitivo e eliminar oocistos no ambiente. Onde não há felídeos silvestres e locais não habitados por humanos, a presença da infecção é virtualmente ausente (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000a).

O gato foi domesticado há mais de 5.000 anos, o homem primitivo buscou nos animais prazer pela companhia e obtenção de proteção (BLERGLER, 1988). Antigamente os gatos eram utilizados para controle de pragas em propriedades rurais, mas nos dias atuais os animais geralmente são considerados membros da família (DABRITZ; CONRAD, 2010). Atualmente a população gatil em lares brasileiros chega a 22,1 milhões (IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015).

Muitos tutores desconhecem o risco de transmissão zoonótica destes animais, e deixam seus animais circularem livremente pelas ruas podendo ingerir presas infectadas com *T. gondii*, e consequentemente eliminar oocistos no ambiente (DABRITZ; CONRAD, 2010). Dependendo da área geográfica, até 73% dos roedores e 71% dos pássaros podem estar infectados com *T. gondii* (SUKTHANA, 2006).

O crescimento desordenado da população gatil gera interesse em saúde pública, pois podem transmitir zoonoses, provocar alergias e agressões por mordeduras (BECK; MEYERS, 1996; CANATTO et al., 2012; SAMPAIO, 2014). São muitas as causas que levam os tutores a abandonarem seus animais, entre elas mudanças nas circunstâncias pessoais, como gravidez, divórcio ou mudança de casa. O abandono também está relacionado à reprodução do animal, levando o tutor a abandonar, principalmente os filhotes nas ruas (MACHADO; PAIXÃO, 2014; ABINPET, 2016).

O ser humano deve ser conscientizado desde a infância que, ser tutor de um animal de estimação é um ato de amor e responsabilidade, devendo realizar a guarda responsável. Tal guarda inclui a realização da vermifugação, vacinação adequada, alimentação saudável, higiene, segurança e castração, os quais garantem o bem-estar animal e a redução nos riscos para a saúde pública (LANGONI et al., 2001).

A toxoplasmose no gato é normalmente assintomática, pois o ciclo enteroepitelial não costuma ocasionar manifestações clínicas (ELMORE et al., 2010), mas podem surgir sinais clínicos como febre, apatia, tosse, dispneia, letargia, anorexia, vômito, icterícia, diarreia, alterações cardíacas, neurológicas e oculares (DUBEY; PROWELL, 2013). Um agente oportunista importante é o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV, em inglês), em gatos coinfectados há uma chance maior de óbito por pneumonia. Além disso, a coinfecção favorece que gatos reagudizem a infecção e voltem a eliminar oocistos nas fezes (WEBSTER, 2010).

Gatos errantes disseminam oocistos pelas vias públicas, aumentando o risco para transmissão da toxoplasmose (REZENDE et al., 2015a). Os oocistos podem ser inativados quando submetidos a temperaturas maiores que 60 °C por dois minutos, mas o oocisto resiste no meio ambiente mesmo em condições adversas, o que leva a perpetuação do parasito na natureza, podendo aumentar a chance de infectar outros animais e até o homem (WEBSTER, 2010). Os resultados sorológicos não se correlacionam diretamente com a carga de oocistos eliminada no ambiente, pois os animais soroconvertem somente após 21 dias da infecção, mas alta soroprevalência na população estudada, sugerem consequentemente uma elevada contaminação ambiental por oocistos (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995; CORNELISSEN et al., 2014). No Brasil, foi verificada a soroconversão de gatos com eliminação de oocistos após seis dias de infecção (TEIXEIRA et al., 2017).

Nessa perspectiva, em Goiânia foi demonstrado recentemente que 13,6% dos gatos errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses estavam liberando oocistos, com soroprevalência de anticorpos IgG em 64% dos animais analisados no mesmo período. (REZENDE, 2015). Diversos trabalhos no país avaliaram a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* (Quadro 1), variando a prevalência entre os estados e também na mesma localidade.

Estado	N	Metodologia	Resultado %	Referência
REGIÃO CENTRO-OESTE				
Goiás	50	MAT	64	REZENDE, 2015
REGIÃO NORTE				
Rondônia	63	MAT	87,3	CAVALCANTE et al., 2006
Amazonas	32	MAT	81	BRAGA et al., 2012
REGIÃO NORDESTE				
Pernambuco (Fernando de Noronha)	25	IFI	72	COSTA et al., 2012
	48	MAT	66,6	COSTA et al., 2012
	45	MAT	44,4	COSTA et al., 2012
Maranhão	200	IFI	50,5	BRAGA et al., 2012
REGIÃO SUDESTE				
Rio de Janeiro	118	HAI	72	MENDES-DE-ALMEIDA; MATTOS; LABARTHE, 2007
	41	HAI	21,9	NETTO; MUNHOZ; ALBUQUERQUE, 2003
São Paulo	100	HAI	58	SANTOS; AMARAL; REBOUÇAS, M.M. DRUMOND, 1983
	100	ELISA	40	MEIRELES et al., 2004
	350	IFI	37,7	CAMARGO et al., 1998
	237	MAT	35,4	PENA et al., 2006
	502	MAT	26,3	SILVA et al., 2002
	27	IFI	25,9	ROSA, 1987
	400	IFI	25	BRESCIANI et al., 2007
	251	IFI	20,3	SOBRINHO et al., 2012
	191	IFI	19,4	LANGONI et al., 2001
	100	MAT	19	SILVA et al., 2002
	248	IFI	17,7	LUCAS et al., 1999
	70	IFI	15,7	COELHO et al., 2011
REGIÃO SUL				
Paraná	58	MAT	84,4	DUBEY et al., 2004b
	163	IFI	73	GARCIA et al., 1999
	282	IFI	16,3	CRUZ et al., 2011
Rio Grande do Sul	27	HAI	40,7	CHAPLIN et al., 1984
	100	HAI	37	ARAÚJO et al., 2003
	245	HAI	26,9	PINTO et al., 2009
	100	HAI	24	MENDEZ, 1983
	49	HAI	10,2	BRACINI et al., 1992
Santa Catarina	300	IFI	14,3	DALLA ROSA et al., 2010

Quadro 1: Panorama da frequência de gatos soropositivos em diversas regiões do Brasil.

IFI: Imunofluorescência Indireta. HAI: Hemaglutinação. MAT: Teste de Aglutinação Modificado. ELISA: Enzaimunoenensaio.

No Brasil, o estado que apresenta a maior soroprevalência para toxoplasmose em gatos errantes é o estado de Rondônia na região Norte com 87,3% (CAVALCANTE et al., 2006), enquanto nas outras regiões do país na região Sul o estado do Paraná apresentou a segunda maior prevalência do país com 84,4% (DUBEY et al., 2004d). No Nordeste em Fernando de Noronha-PE e na região Sudeste no estado do Rio de Janeiro a prevalência foi de 72% (MENDES-DE-ALMEIDA; MATTOS; LABARTHE, 2007; COSTA et al., 2012).

2.5. Infecção por *Toxoplasma gondii* nas galinhas

Galinhas (*Gallus gallus*) caipiras, que são criadas de forma extensiva, são consideradas indicadoras de contaminação ambiental por estarem constantemente expostas à oocistos, pelo fato de se alimentarem diretamente no solo (DUBEY et al., 2003b; ZHU et al., 2008; DUBEY, 2010a). Em criações extensivas a galinha possui uma maior possibilidade de adquirir a infecção e servir de fonte para o ser humano (ALVES, 2007; MILLAR et al., 2012).

Galinhas raramente apresentam sinais clínicos de toxoplasmose (DUBEY, 2010b). Mesmo quando submetidas a inoculação experimental de oocistos por via oral podem permanecer assintomáticas (DUBEY; THULLIEZ, 1993; KANETO et al., 1997). Mas pode ocorrer mortalidade em galinhas experimentalmente infectadas, dependendo da linhagem da galinha utilizada, e da cepa de *T. gondii* utilizada (SCHARES et al., 2017).

A transmissão de *T. gondii* para humanos pela galinha caipira ocorre principalmente através do consumo de carne malcozida, sendo improvável a transmissão pelo consumo de ovos *in natura* (DUBEY; SU, 2009). Como as galinhas caipiras são abatidas na própria propriedade, sem fiscalização de órgãos sanitários, pode ocorrer a infecção nos manipuladores do alimento, caso as mãos não sejam lavadas corretamente após a manipulação da carne (DUBEY, 2010b).

Em todo mundo, estudos foram realizados a fim de se verificar a soroprevalência de *T. gondii* em galinhas caipiras. No Sudão chegou a 100% (HUSSIEN; HASSAN ALFAKI; MOHAMED EL HUSSEIN, 2016). No Quênia a prevalência foi de 83,3% (MOSE et al., 2016). Nas ilhas Granada no Caribe foi detectada uma prevalência de 26,9% (CHIKWETO et al., 2017) e de 41% na ilha de São Cristóvão, também no Caribe (HAMILTON et al., 2017). Nos Estados Unidos foi verificada uma prevalência de 19,4% (YING et al., 2017), na China foi detectada prevalência variando de 12,6% a 18,8% (FENG et al., 2016), no Irã variou entre 17,3% à 18% (MUHAMMAD; GAREDAGHI, 2016; SAYARI; NAMAVARI; MOJAVER, 2016).

Na América do Sul foi verificada prevalência de 55% no Chile, 44% na Colômbia e 28% no Peru, (DUBEY et al., 2004a, 2005, 2006b). No Brasil foram realizados estudos em todas as regiões do país, e os dados desses estudos estão descritos no quadro 2.

Estado	N	Metodologia	Resultado %	Referência
REGIÃO CENTRO-OESTE				
Mato Grosso do Sul	201	MAT	22,9	MOREIRA MARQUES et al., 2009
	40	MAT	67,5	SILVEIRA, 2009
Goiás	50	MAT	50	ALVES, 2007
	150	MAT	38	NETO, 2013
	115	MAT	16,5	NETO et al., 2014
REGIÃO NORTE				
Amazonas	17	HAI	41,2	FERRARONI; MARZOCHI, 1980 <i>apud</i> VIDOTTO, 1992
Pará	34	MAT	58,8	DUBEY et al., 2007
	84	MAT	46,4	DUBEY et al., 2007
Rondônia	50	MAT	66	DUBEY et al., 2006a
REGIÃO NORDESTE				
Alagoas	8	MAT	100	OLIVEIRA et al., 2009
Bahia	20	IFI	42	OLIVEIRA et al., 2009
	200	IFI	25	GALLI et al., 2008
	100	IFI	25	GONÇALVES et al., 2012
Ceará	25	MAT	68	OLIVEIRA et al., 2009
Maranhão	20	MAT	70	OLIVEIRA et al., 2009
Paraíba	167	IFI	49,1	SANTOS, 2012
	483	IFI	31,5	FEITOSA et al., 2016
Pernambuco	20	MAT	60	OLIVEIRA et al., 2009
	56	IFI	46,4	MELO et al., 2016
	212	IFI	40,5	SAMICO-FERNANDES et al., 2015
	629	IFI	27,9	SÁ et al., 2017
Pernambuco (Fernando de Noronha)	430	IFI	88,4	MAGALHÃES et al., 2016
	50	MAT	84	DUBEY et al., 2010
	100	IFI	80	COSTA et al., 2012
Rio grande do Norte	79	IFI	50,6	SANTOS, 2012
	47	MAT	36,2	OLIVEIRA et al., 2009
Sergipe	12	MAT	41,6	OLIVEIRA et al., 2009
REGIÃO SUDESTE				
Espírito Santo	510	MAT	40,4	BELTRAME et al., 2012
Minas Gerais	108	MAT	71,3	LOPES et al., 2016
	28	IFAT	53,6	BRANDÃO et al., 2006
Rio de Janeiro	198	MAT	65,1	DA SILVA et al., 2003
	316	IFI	47,8	CRISTINA et al., 2006
	350	IFI	33,1	MILLAR et al., 2012
	220	IFI	27,6	CASARTELLI-ALVES et al., 2012
São Paulo	82	MAT	39	DUBEY et al., 2002
REGIÃO SUL				
Paraná	40	MAT	40	DUBEY et al., 2003b
	155	IFI	10,3	GARCIA et al., 2000
Rio Grande do Sul	137	IFI	74,4	CAMILLO et al., 2015
	50	MAT	38	DUBEY et al., 2007
Santa Catarina	133	IFI	64,2	TREVISANI et al., 2017
	128	HAI	17,1	PERDONCINI et al., 2010

Quadro 2: Panorama da frequência de galinhas caipiras soropositivas em diversas regiões do Brasil. IFI: Imunofluorescência Indireta. HAI: Hemaglutinação. MAT: Teste de Aglutinação Modificado. ELISA: Enzimaimunoensaio.

No estado de Goiás, ALVES, (2007) encontrou positividade de 50% (25/50) em galinhas caipiras comercializadas em feiras livres na capital Goiânia. NETO (2013) analisando galinhas caipiras na região metropolitana de Goiânia detectou uma prevalência de 38% (57/150) e na região do Oeste Goiano foi verificada prevalência de 16,5% (19/115) (NETO et al., 2014).

2.6. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos e galinhas

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* em animais, assim como no homem, pode ser realizado por métodos imunológicos e parasitológicos, sendo considerados indiretos, a dosagem de anticorpos por técnicas sorológicas; e métodos diretos: a visualização de formas evolutivas do parasito em tecidos ou fezes, por meio de isolamento do parasito em camundongos ou cultura, histopatológico ou detecção do material genético (DNA) com técnicas moleculares como a da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A utilização de cada método depende da amostra biológica utilizada e da informação que se pretende obter com cada animal (LANGONI et al., 2001; DUBEY, 2010b).

2.6.1. Diagnóstico sorológico

A pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* é a técnica mais utilizada no diagnóstico sorológico (HILL; DUBEY, 2002). A Imunofluorescência Indireta (IFI), Hemaglutinação indireta (HAI), Enzimaimunoensaio (ELISA) e o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) vem sendo empregadas com boa sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos em galinhas, que se positivam após 15 dias de infecção (DUBEY, 2010a).

2.6.2. Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é utilizado para a confirmação da presença do parasito, sendo indicado principalmente na fase aguda e ativa. Diversas amostras biológicas podem ser utilizadas, como sangue, urina, líquido amniótico, fragmentos de biópsias, entre outros (MURAT et al., 2013). As técnicas parasitológicas são utilizadas de acordo com o objetivo do trabalho, as moleculares na detecção do material genético do parasito, e bioensaio em camundongos, para o isolamento do parasito (SARAF et al., 2017).

2.6.3. Isolamento do parasito pelo bioensaio

Após a digestão péptica de tecidos, os mesmos são inoculados em camundongos (DUBEY, 1998). Os órgãos mais utilizados são o coração, o pulmão, cérebro e baço (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000a). O isolamento do parasito a partir dos tecidos depende da quantidade de parasitos contidos na amostra, da quantidade de camundongos inoculados e do genótipo do parasito (DUBEY et al., 2006a; PENA et al., 2008).

As vias de inoculação são a via intraperitoneal (IP), via oral (VO) e subcutânea (SC). A via mais utilizada é a via IP, que apresenta uma alta infectividade em camundongos (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970). O isolamento também depende da linhagem do camundongo, sendo as linhagens CD-1, CF-1 e Swiss-Webster as mais susceptíveis para *T. gondii* (SARAF et al., 2017).

Com os isolados obtidos por bioensaio é possível realizar testes de avaliação da virulência e patogenicidade, sendo possível determinar se o isolado é letal para camundongos e/ou é capaz de estabelecer infecção crônica. Tais testes são importantes para inferência de sinais clínicos, caso ocorresse a infecção em seres humanos (SHWAB et al., 2016).

2.6.4. Técnicas moleculares

A PCR é utilizada para detectar o parasito em diversas amostras biológicas, nos tecidos apresenta alta sensibilidade e especificidade (KLUN et al., 2017). Os alvos mais utilizados são os genes B1, P30 e 18S rDNA de *T. gondii* (TENTER, 2009). Estima-se que a sensibilidade de detecção da presença do parasito seja de apenas um cisto para cada 100 gramas de tecido. Quando o parasitismo é menor, no entanto, pode-se obter resultados falso negativos (HILL; DUBEY, 2002; ALFONSO et al., 2009). Entretanto, apesar da elevada sensibilidade na detecção do parasito por métodos moleculares, este método não permite determinar a viabilidade do parasito, sendo necessária assim a realização do bioensaio para tal (GUTIERREZ et al., 2010).

A especificidade da PCR para *T. gondii* pode chegar a 100 %, mas a presença de inibidores da reação, a dificuldade de concentrar o parasito, e a dificuldade na extração do DNA de certas amostras, pela resistência das membranas dos cistos tissulares e do oocisto por exemplo, pode levar a redução da sensibilidade (ALFONSO et al., 2009). Nesse sentido

a sensibilidade pode ser melhorada utilizando a *Nested-PCR*, que consiste em duas reações de amplificação, empregando-se dois pares de *primers* para cada reação.

2.7. Diversidade genética de *Toxoplasma gondii*

A população de *T. gondii* foi descrita inicialmente nos primeiros estudos de epidemiologia molecular, com baixa variabilidade genética. A clonalidade de *T. gondii* foi evidenciada pelos isolamentos de cepas com genótipos idênticos de diferentes hospedeiros provenientes de áreas geográficas distintas. A divergência genômica entre as cepas era de 1% (AJIOKA; FITZPATRICK; REITTER, 2001). Assim, o parasito *T. gondii* foi descrito como altamente clonal, com baixa diversidade genética. No entanto, foi demonstrado em estudos realizados na Europa e nos Estados Unidos a existência de três tipos clonais predominantes, em tipo I, II e III (DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002; SU; ZHANG; DUBEY, 2006).

Todas as três linhagens têm ampla distribuição geográfica e podem infectar diferentes espécies animais, inclusive o homem. Cepas do tipo I estão relacionadas à toxoplasmose humana congênita e a virulência aguda em camundongos, cepas do tipo II relacionam-se aos casos de reativação da infecção crônica em humanos e as cepas do tipo III estão associadas às infecções animais (HOWE; SIBLEY, 1995; DUBEY et al., 2002).

DARDÉ; AJZENBERG; SMITH, (2007) descreveram que uma população com estrutura fortemente clonal determina características biológicas, por exemplo, a virulência, poderia ser atribuída a subgrupos geneticamente bem definidos da população de parasitos. Estudos relacionados com polimorfismos genéticos demonstraram que as cepas mais virulentas de *T. gondii* são oriundas de um único clone ancestral, e que desde então poucas recombinações gênicas ocorreram (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; GRIGG et al., 2001).

Vários mecanismos explicariam existência de uma população clonal, primeiramente para ocorrer à transmissão do parasito, o ciclo sexual não é obrigatório, estágios intermediários podem ser transmitidos através da alimentação carnívora e onívora (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000b; SIBLEY et al., 2009). Um macrogameta infertilizado pode se diferenciar em oocisto para completar o ciclo no intestino do felídeo através da partenogênese (FERGUSON, 2002). Como a coinfeção por múltiplas cepas é rara, os felídeos liberam oocistos com descendência genética idêntica, uma vez que a

complexidade genética limitada é mantida, essa descendência seria facilmente mantida. Para o felídeo liberar oocistos com características genéticas mistas, ele deveria ingerir cepas de presas diferentes ou ingerir presas com infecção mista, porém esse evento deveria acontecer em um intervalo de tempo bem curto (AJZENBERG et al., 2004; SIBLEY et al., 2009).

Apesar da “teoria da clonalidade” ter sido considerada por muitas décadas, a evolução das técnicas moleculares, principalmente utilizando microssatélites e análises de polimorfismo de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição pela reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR) foram discriminatórios, demonstrando que o parasito é altamente diversificado geneticamente, não devendo ser considerado um clone como anteriormente descrito, principalmente pela detecção de cepas atípicas (BRANDÃO et al., 2006; LEHMANN et al., 2006; PENA et al., 2008).

Além das três linhagens arquetípicas clonais, as linhagens atípicas podem ser responsáveis por infecções graves ou letais em indivíduos imunocompetentes, podendo provocar pneumonia, miocardite, meningoencefalite ou polimiosite (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

2.8. Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (RFLP-PCR)

A RFLP-PCR vem sendo utilizada para a genotipagem de isolados de *T. gondii*, pois é um método simples, rápido, reprodutível, e pode ser utilizado em larga escala. A PCR é realizada para amplificar um gene de interesse, em seguida o produto de PCR é submetido à digestão por enzimas de restrição, onde serão detectadas variações mínimas de um gene, sendo que uma substituição de uma base pode extinguir ou originar um sítio capaz de ser digerido pelas endonucleases de restrição, que reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases (SINGH, 1997; AJZENBERG; DUMÈTRE; DARDÉ, 2005). Além disso, a técnica permite a diferenciação de alelos atípicos (u-1 e u-2) e detecção de combinação de alelos de diferentes arquétipos (SU; ZHANG; DUBEY, 2006).

A utilização de RFLP-PCR para a genotipagem é necessária para avaliar a diversidade real da população de *T. gondii*, além de encontrar fatores genéticos que podem influenciar na virulência, entender eventuais mecanismos de seleções genotípicas de acordo com a

espécie hospedeira ou tentar relacionar o genótipo do parasito às manifestações clínicas da toxoplasmose (DARDÉ; AJZENBERG; SMITH, 2007).

Vários estudos utilizando a técnica RFLP-PCR foram realizados em todo o mundo, mas a dificuldade na padronização e o grande número de marcadores utilizados na técnica dificultam a comparação de resultados em diversos laboratórios. SU; ZHANG; DUBEY, (2006) desenvolveram um conjunto de marcadores para *T. gondii*, que facilitam a distinção e a diferenciação dos arquétipos de tipos atípicos, e formas de revelar a diversidade genética dos parasitos. A utilização desses marcadores pelos pesquisadores permite a identificação dos isolados mistos com maior segurança e facilitam o estudo da epidemiologia molecular e comparação entre os diversos estudos realizados. Estão sendo utilizados na pesquisa 11 *loci* gênicos (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, SAG2 alt, BTUB, GRA6, c22-8, c29- 2, L358. *PK1*, Apico). Estes marcadores tem permitido a confirmação da presença de uma população clonal de *T. gondii* muito variada no Brasil (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; PENA et al., 2008).

No Brasil os primeiros estudos de caracterização molecular dos isolados foram realizados por DUBEY et al., (2002) estudando 25 isolados de *T. gondii* de galinhas provenientes de áreas rurais de São Paulo, mostrou predominância da linhagem I, mas também encontrou em menor frequência a linhagem III. Resultados similares (linhagens I e III) foram encontrados em isolados provenientes de gatos no estado do Pará (DUBEY et al., 2004b) levando a crer que estas duas cepas sejam as mais frequentes no Brasil.

PENA et al. (2008) analisando 46 genótipos isolados de gatos em São Paulo e 125 isolados provenientes de galinhas, gatos e cães e de outros gatos do Brasil, incluiu o marcador CS3, localizado no cromossomo VIIa e relacionado a virulência aguda, caracterizou as linhagens clonais típicas do Brasil em BrI, BrII, BrIII e BrIV, sendo diferentes dos tipos clássicos. Isso se deve pela alta diversidade genética dos isolados, sendo que quatro isolados foram identificados em diferentes hospedeiros em diferentes regiões geográficas. Os genótipos foram classificados de acordo com seu padrão de virulência em BrI virulento, ao genótipo BrIII avirulento, enquanto os genótipos BrII e BrIV com virulência intermediária. A virulência foi determinada pela mortalidade de camundongos, em virulentas (100% de mortalidade), intermediárias (>30% de mortalidade) e avirulentas (<30% de mortalidade).

DUBEY et al. (2008) analisando 151 isolados obtidos de galinhas caipiras de vários estados do Brasil identificou 58 genótipos diferentes, sendo que 29 genótipos foram caracterizados em um único isolado, e 29 genótipos foram identificados em dois ou mais isolados. Apenas um isolado era do tipo clonal I e cinco do tipo clonal III, a linhagem clonal II não foi detectada. Esse estudo confirmou uma alta diversidade genética dos isolados independentemente da localização geográfica, conforme já demonstrado por PENA et al. (2008).

Quando se compararam os genótipos em diferentes hospedeiros e localização geográfica não observaram relação entre os mesmos. Com isso, sugere-se que o parasito possui uma comunidade epidêmica no Brasil, nas quais mudanças genéticas frequentes tem gerado uma gama de cepas recombinantes, (PENA et al., 2008).

3. JUSTIFICATIVA

T. gondii é um protozoário de elevada prevalência mundial em humanos e animais, com registros em todos os continentes, mesmo em condições desfavoráveis do clima. Isso ocorre devido aos diversos mecanismos de transmissão do parasito, características genéticas e adaptação aos mais diversos hospedeiros.

A infecção em humanos gera graves problemas em saúde pública, principalmente os casos de toxoplasmose congênita, que leva a mais variadas malformações nos conceptos. Nos portadores do vírus HIV, o parasito é um dos principais agentes oportunistas que acarreta um grande número de óbitos.

Assim, é de suma importância estudos de isolamento e caracterização molecular de isolados de *T. gondii*, permitindo a investigação da distribuição do parasito, bem como o padrão de virulência das cepas que circulam numa determinada região, com isso é possível compreender a transmissão entre os mais diversos hospedeiros, a imunogenicidade e a patogenicidade.

Pela elevada prevalência registrada em humanos e gatos em Goiânia, essa tese se dedica a realização do primeiro estudo de caracterização molecular associada a análise de virulência e morfometria realizado com isolados de *T. gondii* oriundos do estado de Goiás. Para isto, foram utilizados gatos errantes por serem o hospedeiro definitivo e considerado o principal agente de perpetuação do parasito no meio ambiente. E foram utilizadas galinhas caipiras criadas de forma extensiva, pelo fato de serem indicadores de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a concordância das técnicas laboratoriais empregadas no diagnóstico de *T. gondii*, verificar a soroprevalência em gatos errantes e galinhas caipiras da região Metropolitana de Goiânia, determinando os genótipos dos isolados e correlacioná-los quanto a virulência e aspectos morfométricos dos mesmos.

4.2. *Objetivos Específicos*

- Verificar a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em gatos errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia (CCZ) na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás.
- Determinar a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em galinhas caipiras criadas de forma extensiva na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás.
- Realizar o diagnóstico molecular a partir de amostras de tecidos de gatos e galinhas através da técnica de PCR.
- Avaliar a concordância entre as técnicas diagnósticas HAI e PCR.
- Isolar *T. gondii* a partir de tecidos dos gatos e galinhas caipiras em camundongos.
- Determinar a virulência dos isolados de *T. gondii* obtidos em camundongos da linhagem BALB/c.
- Caracterizar morfometricamente os isolados obtidos molecular a partir de amostras de tecidos de gatos e galinhas.
- Caracterizar molecularmente os isolados obtidos de amostras de tecidos de gatos e galinhas.

5. MÉTODOS

5.1. Delineamento Experimental

O estudo é do tipo transversal e descritivo, realizado entre os meses de março de 2015 a junho de 2017.

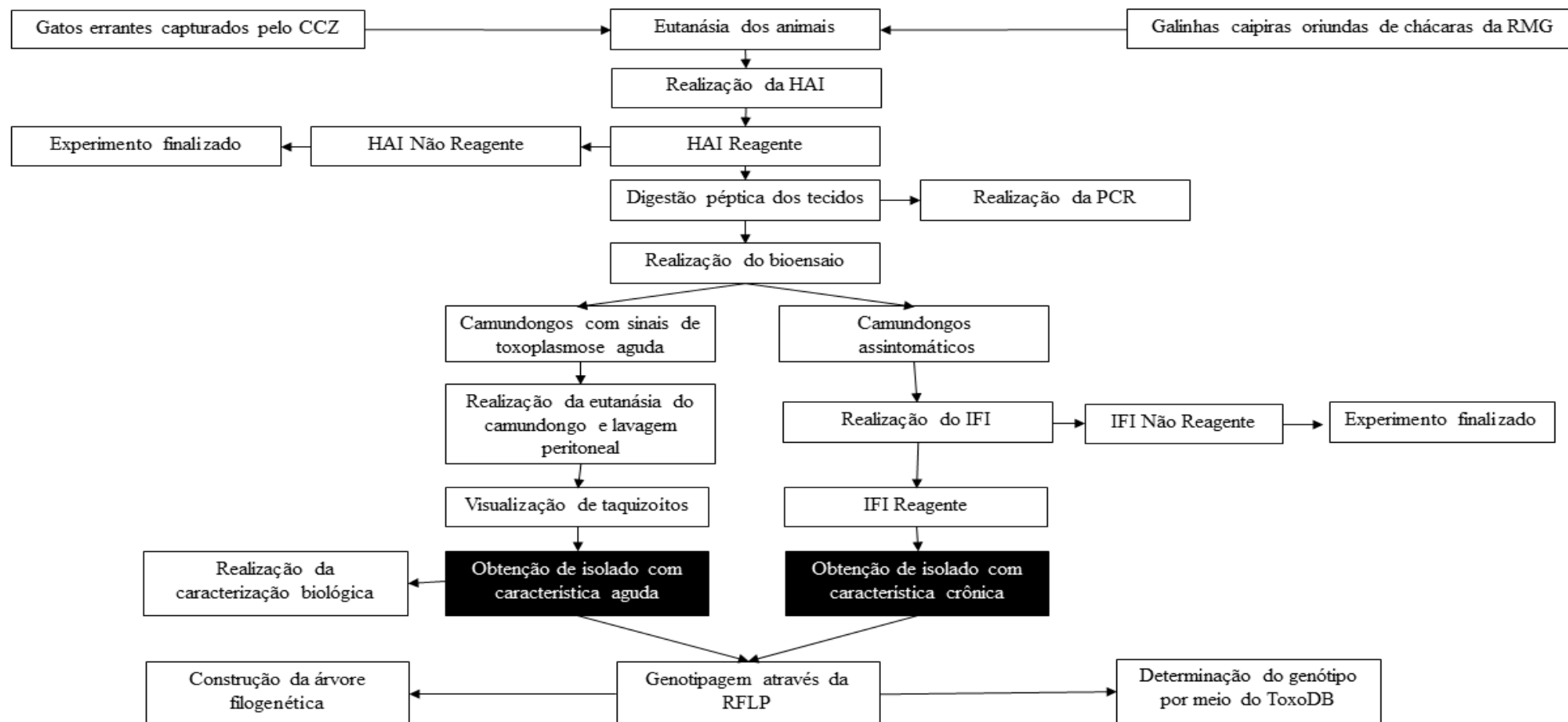


Figura 4: Delineamento experimental realizado nesta pesquisa.

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses; HAI: Hemagluinação Indireta; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; RMG: Região Metropolitana de Goiânia; IFI: imunofluorescência indireta; RFLP: Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos

5.2. Considerações éticas

O projeto para utilização de gatos e galinhas foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Goiás, Brasil (CEUA/UFG), sob o protocolo 024/2016 (Anexo 1). A aprovação para estudos de casos de toxoplasmos em recém-nascidos foi aprovado pelo parecer 2.125.736 pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Goiás e Comitê de ética do Hospital das Clínicas (Anexo 2).

5.3. Descrições dos grupos do estudo

O estudo foi realizado na Região Metropolitana de Goiânia (RMG) em Goiás, que foi criada pela lei complementar número 27 de 30 de dezembro de 1999, sendo representada por 11 municípios, foram então adicionados mais sete municípios e criada a Região de Desenvolvimento Integrado de Goiânia. Os 18 municípios se destacam pelo desenvolvimento econômico, e alguns pelo desenvolvimento agrícola, como a avicultura, horticultura, bovinocultura e fruticultura (GOIÂNIA, 2017).

Foram analisados gatos errantes oriundos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), da Secretaria Municipal de Vigilância Epidemiológica de Goiânia, Goiás. Os animais foram capturados pela equipe do CCZ, e por motivos operacionais do CCZ não foi possível determinar a localização de captura dos animais. Ressaltamos que de acordo com o regulamento do CCZ, somente os animais que estão doentes são sacrificados, e os animais saudáveis são encaminhados à adoção e aos abrigos de animais. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais (Foto 5), em uma sala cedida para o estudo no CCZ, para que fosse realizada uma melhor avaliação do animal. Os animais foram identificados quanto ao sexo e faixa etária (jovem ou adulto).



Figura 5: Gato errante capturado pelo Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia, isolado em gaiola em observação. Fonte: Arquivo do autor.

Também participaram do estudo galinhas caipiras adquiridas em propriedades rurais na RMG (Tabela 1). Só foram adquiridas galinhas cuja criação era extensiva, e os animais foram selecionados aleatoriamente nas propriedades. A seleção das propriedades rurais foi aleatória, de acordo com a disponibilidade de animais com os critérios adotados nessa pesquisa: criadas soltas em contato com o solo e que a alimentação era livre no ambiente suplementada com ração animal.

Tabela 1: Localização das propriedades que participaram do experimento e número de galinhas coletados.

Município da propriedade	Número de galinhas
Abadia de Goiás	10
Aparecida de Goiânia 01	9
Aparecida de Goiânia 02	8
Goiânia	5
Hidrolândia	10
Trindade	8

Todas as propriedades participantes possuíam criação de subsistência, e comercializavam uma pequena quantidade de produtos agropecuários, como queijos, linguiças, ovos e galinhas caipiras. Em todas, existia a presença de animais criados soltos, como cães, outras aves e gatos conforme pode ser observado na figura 6:



Figura 6: Gatos domésticos em propriedades rurais, bem como o convívio entre o gato e a galinha caipira.

Fonte: Arquivo do autor.

Os procedimentos experimentais que compreendem as análises sorológicas, inoculação em camundongos, análises parasitológicas e moleculares, foram realizadas no Laboratório de Estudos da Relação Parasito Hospedeiro no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (LAERPH-IPTSP-UFG).

5.4 Eutanásia dos animais e coletas de amostras biológicas

5.4.1 Gatos errantes

O CCZ segue uma rotina semanal de eutanásia dos animais doentes. O procedimento é realizado pelo veterinário responsável do CCZ, estando de acordo com a resolução de eutanásia de animais do COCEA (Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação) (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2015).

Os gatos sofreram contenção física pela pele que revestia sua região cervical, logo atrás das orelhas, procedimento necessário na imobilização do animal, impossibilitando assim que o animal virasse a cabeça e que o auxiliar do veterinário não sofresse mordedura durante o procedimento de eutanásia. Os animais foram então anestesiados com tiopental sódico via intramuscular, na superdosagem de 25 mg/kg, o que ocasionava a morte dos animais. Em seguida, foi coletada uma amostra de 3 mL de sangue total por punção

intracardíaca, as amostras foram acondicionadas em tubo vácuo contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), para posterior análise.

Cada cadáver então foi necropsiado e extraído, com o auxílio de bisturi descartável, fragmentos de músculo e o coração; com o auxílio de uma serra foi realizada a craniotomia para extração do cérebro. Os tecidos foram acondicionados em sacos plásticos e em uma caixa com gelo.

5.4.2 Galinhas caipiras

As galinhas foram submetidas a eutanásia na propriedade onde foram adquiridas. Os animais foram contidos pelas patas e asas, em seguida sofreram deslocamento cervical seguida por exsanguinação. Nesse momento foi colhido o sangue com o auxílio de um saco plástico, sem utilização de anticoagulante, para posteriormente no laboratório ser separada uma amostra de soro.

Após a colheita do sangue, a galinha sofreu decapitação para retirada da cabeça e com o auxílio de um bisturi estéril foi retirado o coração. Os tecidos foram acondicionados em sacos plásticos e em uma caixa com gelo. No LAERPH, foi realizada a craniotomia para retirada do cérebro, utilizado na infecção experimental.

5.5 Realização da Hemaglutinação Indireta (HAI)

Foi utilizado o *kit* comercial Toxotest[®], marca Wiener Lab, seguindo as especificações do fabricante. 25 µL do controle positivo, controle negativo e os soros testados foram pipetados na placa de fundo “V”, diluídos na concentração de 1:32 com a solução diluente do *kit*. Cada amostra do soro do animal foi diluída diretamente na placa até a concentração 1:1024, em diluição seriada de fator 2. A seguir foi adicionado 25 µL da solução antigênica, constituído por hemácias de carneiro sensibilizadas com antígenos solúveis de *T. gondii*.

A placa foi levemente agitada, e incubada por um período de 90 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, a leitura foi realizada a olho nu. A reação foi considerada não reagente quando as hemácias formaram um “botão” no fundo do poço, pela sedimentação. Amostras foram consideradas positivas quando formaram um véu

uniforme recobrando a cavidade do poço. O título de cada amostra positiva foi determinado até o último poço onde a hemaglutinação (véu) foi observada, variando então títulos de 32 até ≥ 1024 .

5.6 Processamento das amostras de tecido

As amostras de tecidos foram utilizadas integralmente e processadas segundo DUBEY (1998). Primeiramente os tecidos foram pesados e cortados em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura esterilizada para cada amostra, foi adicionada solução salina na proporção de 250 mL para cada 50 gramas de tecido. Os tecidos foram macerados em um processador doméstico, o “pool” de tecido foi acondicionado em um béquer e foi adicionado o mesmo volume de solução de pepsina ácida (pepsina 2,6 g; NaCl 5,0 g; HCl 7,0 mL e água destilada para o completar o volume de 500 mL, pH de aproximadamente 1,1-1,2) pré-aquecida a 37° C. O béquer foi então colocado em banho Maria 37° C por 1 hora sob agitação.

Após a incubação, o homogeneizado foi filtrado através de duas camadas de gaze e então transferida para cinco tubos cônicos de 50 mL e centrifugado a 1.200 g por 10 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi neutralizado pela adição de bicarbonato de sódio 1,2 %, pH 8,3, preparado no momento do uso. Sendo adicionado cerca de 5 mL em cada tubo. A neutralização é visualmente percebida pela mudança na cor do sedimento. Após a homogeneização, o material foi transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 50 mL com salina e centrifugado novamente a 1.200 g por 10 minutos.

Novamente o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado igual volume de salina estéril contendo 1000 U de penicilina e 200 mg de estreptomicina. Imediatamente o material foi inoculado em um grupo de três camundongos da linhagem Swiss, na quantidade de 1 mL em cada animal por via intraperitoneal.

5.7 Bioensaio em camundongos

5.7.1 Acompanhamento dos animais

Foram utilizados camundongos machos e/ou fêmeas da linhagem Swiss, com aproximadamente dois meses de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Cada grupo era constituído por três animais em gaiolas.

Foi garantido aos camundongos o bem-estar, como temperatura e umidade controlada, bem como água e ração esterilizada oferecidas à vontade. Foi realizado enriquecimento ambiental das gaiolas com a adição de papel toalha esterilizado para formação de ninhos, e canos plásticos para abrigo. Outro ponto observado foi à necessidade da vida em grupo, quando animais do grupo morreram e restou apenas um animal, o animal restante foi acondicionado em gaiola transparente para que ele pudesse observar animais da mesma espécie, diminuindo o estresse.

Os camundongos foram acompanhados diariamente, para observação de sinais de toxoplasmose aguda. Os sinais incluem letargia, pelo arrepiado (Figura 7-A), e diarreia (Figura 7-B). Os animais sintomáticos foram sacrificados e realizado o lavado intraperitoneal com salina, para a observação de taquizoítos (Figura 8 A-B). Os lavados quando positivos foram novamente inoculados por via intraperitoneal, em um outro grupo de camundongos, para a manutenção do isolado

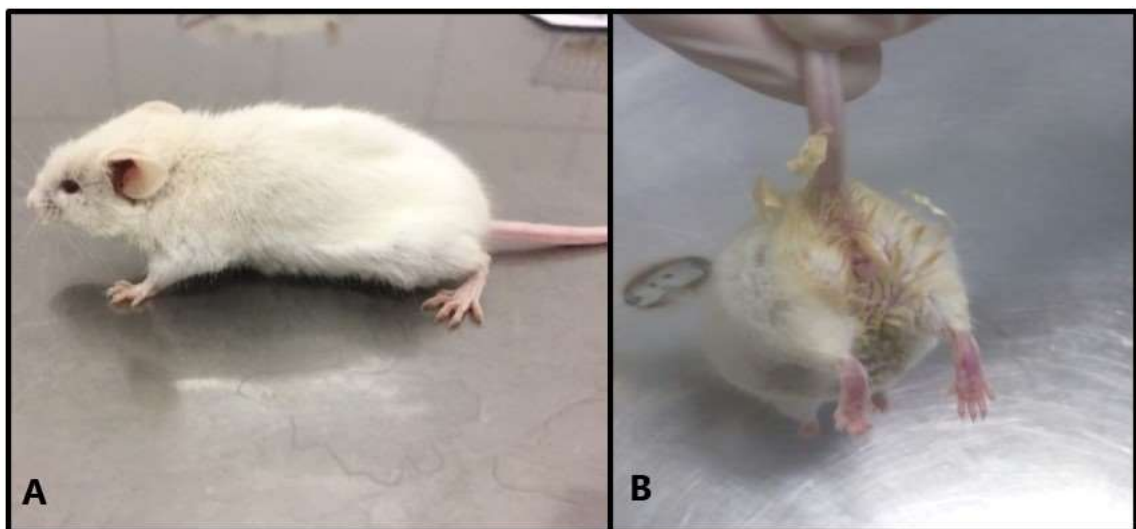


Figura 7: (A) camundongo com sinais clínicos de toxoplasmose aguda, incluindo dificuldade respiratória e pelos arrepiados; (B) camundongo apresentando diarreia. Fonte: Arquivo do autor.

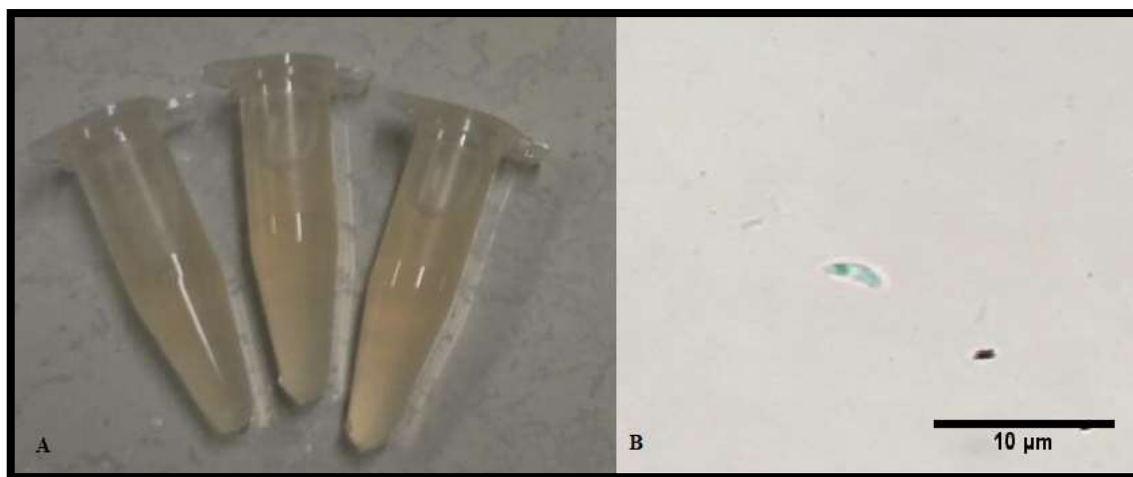


Figura 8: (A) lavado peritoneal turvo; (B) microscopia de lavado peritoneal a fresco, apresentando taquizoítos. Fonte: Arquivo do autor.

Os camundongos que não apresentaram sinais agudos de infecção foram eutanasiados após 60 dias de inoculação, sendo realizada a sorologia por IFI para confirmação e a pesquisa de cistos teciduais contendo brazoítos do *T. gondii* em fragmentos de cérebro (Figura 9).

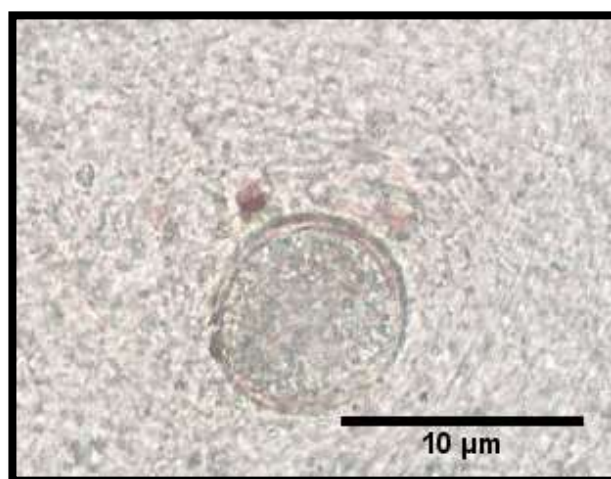


Figura 9: Cisto (Seta) contendo bradizoítos de *Toxoplasma gondii* em cérebro de camundongo cronicamente infectado, a fresco entre lâmina e lamínula. Fonte: Arquivo do autor.

Os isolados foram nomeados segundo normas definidas previamente no “Toxoplasma Centennial Congress” (Buzios, RJ, 2009) como TgCkBrGO 01 até 15 (Tg = *Toxoplasma gondii*; Ck = Chicken; Br = Brasil; GO = Goiás).

5.8 Morfometria dos isolados obtidos

Após o isolamento do parasito foram confeccionadas cinco lâminas a partir do lavado peritoneal de cada isolado. As lâminas foram fixadas e coradas pelo método do Panótico (Instant Prov®). As lâminas foram feitas com a adição de algumas gotas do lavado (~25 µL) em uma lâmina nova, e foram levadas à estufa por um período de 24 horas à 25 °C para secagem. Posteriormente foi realizada a coloração com Panótico conforme orientação do fabricante.

Os taquizoítos foram fotografados com utilização de microscópio Zeiss® acoplado a uma câmera digital Sony® para registro e digitalização dos resultados obtidos. As imagens foram analisadas através do programa Image J® a partir da avaliação de características morfológicas dos parasitos como: comprimento longitudinal, largura na altura do núcleo e distância entre núcleo e complexo apical. Estes parâmetros foram avaliados nos isolados e na cepa padrão RH88. Para cada lâmina, foram documentados 100 taquizoítos e os valores de cada parâmetro foi salvo em planilha do programa Microsoft Excel® para calcular as médias e desvio padrão das medidas dos taquizoítos de cada isolados.

As medidas dos isolados foram comparadas com a cepa padrão RH88 através do programa Sigma Stat 3.2, utilizando o teste t. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5.9 Análise de virulência dos isolados

Para constatar a virulência das cepas, foram preparadas diluições dos lavados peritoneais de cada isolado em ordem crescente, sendo 100, 1.000, 10.000, 100.000 e 1.000.000 taquizoítos/mL. A contagem dos taquizoítos foi realizada em câmara de Neubauer. Posteriormente, foram contados os taquizoítos presentes em cinco quadrantes (cantos e central), a fim de estabelecer uma média e estimar a quantidade de parasitos por mL e preparar as diluições. Para cada diluição, foram inoculados 0,1 mL em cada um dos três camundongos da linhagem BALB/c que foram observados diariamente (SARAF et al., 2017). Os animais que não apresentaram sinais clínicos compatíveis com a infecção aguda após um período de 30 dias, foram submetidos a eutanásia, seguida de punção cardíaca para obtenção de amostra de soro para realização da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para observar soroconversão e uma possível infecção crônica (CAMARGO, 1964).

Com os resultados dos intervalos de óbito, foram delineadas curvas de virulência de cada isolado e comparadas com a curva da cepa padrão RH88, para se estabelecer o comportamento biológico do isolado.

As curvas de virulência foram analisadas por meio da comparação da taxa de sobrevivência entre os camundongos inoculados com os isolados e a cepa padrão (LOPES et al., 2016). Os gráficos das curvas foram construídos no programa GraphPad Prism.

5.10 Extração de DNA

Foram realizadas extrações de DNA diretamente do homogenado dos tecidos coletados dos gatos e galinhas caipiras, e pelos lavados peritoneais de camundongos com isolados agudos. Nos camundongos com isolados crônicos foi realizada a extração do *pool* de cérebro e pulmão.

A extração do DNA foi realizada com o KIT comercial BIOPUR® com uma adaptação, as amostras após a adição do tampão de lise e da Proteinase K foram incubadas à 37° C *overnight*, posteriormente a extração seguiu o protocolo do fabricante.

5.11 Detecção do *Toxoplasma gondii* por PCR

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 17,3 µL H₂O Mili-Q estéril, 1,0 µL de MgCl₂, 2,5 µL de Tampão 10X (Invitrogen®), 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®), 0,5 mM de cada desoxinucleotídeos (dATP/ dTTP/ dGTP/ dCTP, Sigma®), 50 pmoles de cada iniciador da reação (Invitrogen®) e 2µL de DNA extraído. Os pares de primers utilizados foram: Toxo-B5 (5'-TGA AGA GAG GAA ACA GGT GGT CG-3'), Toxo-B6 (5'-CCG CCT CCT TCG TCC GTC GTA-3') (SANTOS; PENA; EPPLEN, 1993).

As reações foram realizadas no termociclador Master Cycler Personal®. O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94 °C (5 min), 35 ciclos de desnaturação a 94 °C (1 min), anelamento a 62 °C (1 min) e extensão a 72°C (1 min) seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Foram utilizados como controle positivo amostras de DNA extraído de líquido peritoneal, sangue e tecidos de camundongos infectados com a cepa RH88 e/ou ME49. Para controle negativo foi utilizado o sangue de um camundongo jovem não infectado proveniente do biotério do IPTSP.

Os produtos amplificados pela PCR com o tamanho de 110pb foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% revelados pela prata.

5.12 *Comparação entre a HAI e a técnica de PCR.*

Foi analisada a eficiência entre as técnicas HAI e PCR por meio do teste estatístico Qui-quadrado (X^2) através do programa SPSS (SPSS, INC.).

Além do X^2 , foi calculado o índice *Kappa* (k), que é uma forma de avaliar a concordância entre técnicas diagnósticas. O k informa a proporção de concordância não aleatória entre as técnicas utilizadas, e seu valor varia de "menos 1" (completo desacordo) a "mais 1" (concordância total). Se a medida concorda mais frequentemente do que seria esperado pela chance, então o índice k é positivo; se a concordância é completa $k = 1$. Zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso (KRAEMER; BLOCH, 1988). A Tabela 2 demonstra a interpretação do índice k :

Tabela 2: Escala de concordância do índice *kappa*

<i>Kappa</i>	<i>Concordância</i>
< 0,00	Nenhuma
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Adaptado de KRAEMER; BLOCH, 1988

5.13 Genotipagem dos isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos por Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (RFLP-PCR)

A genotipagem dos isolados de *T. gondii* foi realizada utilizando um conjunto de 12 marcadores genéticos: SAG1, SAG2 (3'SAG2 e 5'SAG2), SAG2-alt SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, APICO e CS3 (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; PENA et al., 2008; DUBEY; SU, 2009).

Foram utilizados como isolados de referência GT1 (Tipo 1), PTG (tipo 2), CTG (Tipo 3), e foram utilizados isolados atípicos: TgCgCa1 (ou Cougar), MAS, TgCatBr5, TgCatBr64 e TgRsCr1 (SU; ZHANG; DUBEY, 2006). As sequências alvo do DNA foram primeiramente amplificadas por PCR-Multiplex utilizando primers externos de todos os marcadores, seguida de uma *Nested-PCR* utilizando primers internos individualmente para cada marcador.

A reação da PCR-*multiplex* foi realizada em 25 µL, 10x tampão de PCR, 25 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada primer, 2U de Taq-DNA polimerase (Invitrogen®), 2 µL de DNA e H₂O Mili-Q estéril. Foi utilizada a seguinte programação: 95 °C por 4 minutos para desnaturação inicial, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 55 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 2 minutos para extensão e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

A reação da *Nested-PCR* foi realizada da mesma forma como descrito acima, com as seguintes características de programação: 95 °C por 4 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 60 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos para extensão e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Em seguida, os produtos da *Nested-PCR* foram clivados por meio de enzimas de restrição e condições de temperatura e tempo (Tabela 3) específicos para cada marcador (SU; ZHANG; DUBEY, 2006). Para cada reação, 3µL do produto da *Nested-PCR* foi adicionado com 17 µL de reação de digestão, contendo Tampão 10x NEB, 0,1mg/mL de BSA e uma unidade de cada enzima. Todos os produtos foram visualizados sobre luz UV depois de realizada eletroforese em gel de agarose 2,5 ou 3 %, dependendo do marcador, corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

Tabela 3. Primers utilizados para RFLP-PCR

Marcadores	Primers PCR-multiplex (primers externos)	Primers Nested-PCR (primers internos)	Referência
SAG1	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	(GRIGG et al., 2001; DUBEY et al., 2006a)
5'-SAG2	Não necessário. O fragmento de DNA para 5'SAG2 é reconhecido pelos primers externos de alt.SAG2	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	(HOWE et al., 1997)
3'-SAG2	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	(HOWE et al., 1997)
alt.SAG2	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTGACCGAGCGGGAGCAC	(LEHMANN et al., 2000; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
SAG3	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	(GRIGG et al., 2001)
BTUB	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	(KHAN, 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
GRA6	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	(SU; ZHANG; DUBEY, 2006).
c22-8	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTTCGC	(KHAN, 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
c29-2	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	F: AGTTCCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	(KHAN, 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
L358	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTTCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	(KHAN, 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
PK1	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	(KHAN, 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
Apico	F: TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R: AACGGAATTAATGAGATTGAA	F: GCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCCTTGATA	(SU; ZHANG; DUBEY, 2006)
CS3	F: GTGTATCTCCGAGGGGTCT R: TGTGACTTCTTCGCAATCGAC	F: AGCGGATTTCCAACACTGTC R: CTGCTGCATTACAAACTCC	(PENA et al., 2008)

Iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) indicam as extremidades 5' e 3', respectivamente.

Os resultados obtidos foram analisados, comparados e classificados de acordo com os genótipos presente no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). E os genótipos foram analisados filogenicamente, sendo transformados em dados binários (Tabela 4), no programa *SplitsTree* (HUSON; BRYANT, 2006), a fim de se obter a relação filogenética entre os genótipos obtidos no estudo e os já isolados em outras regiões do Brasil.

Tabela 4: Códigos binários dos genótipos para construção da árvore filogenética pelo programa *SplitsTree*.

	SAG1	SAG2	alt.SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	APICO
I	'10001	'100100	'00110	'00111	'10101	'10001	'0001110	'01000	'1000	'1001000101	'10001
II	'01010	'100011	'00101	'10000	'01110	'01100	'0010110	'00011	'0101	'0000111101	'01101
III	'01010	'011100	'01010	'01010	'00111	'00111	'0100110	'10000	'0011	'1000010101	'10011
u-1	'00111		'10001				'0001111	'00110		'0100000110	
u-2							'1000010			'0100010101	
u-3										'0010010110	

6. RESULTADOS

Artigo 1 – Primeiro estudo de isolamento, caracterização genotípica e fenotípica de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras na Região Metropolitana De Goiânia, Goiás, Região Centro-Oeste, Brasil

Hanstter Hallison Alves Rezende, Jaqueline Ataíde Silva Lima, Antônio Roberto Gomes-Júnior, Jade de Oliveira Melo, João Luís Garcia, Heloísa Ribeiro Storchilo, Taynara Cristina Gomes, Marina Clare Vinaud, Ana Maria de Castro.

Parasitology Veterinary. ISSN 0304-4017. Fator de impacto: 2.356 (Será Submetido).

Artigo 2 - Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e DNA do parasito em gatos errantes em Goiânia, Goiás, Região Centro-Oeste, Brasil.

Hanstter Hallison Alves Rezende, Jaqueline Ataíde Silva Lima, Antônio Roberto Gomes-Júnior, Jade de Oliveira Melo, Heloísa Ribeiro Storchilo, Taynara Cristina Gomes, Marina Clare Vinaud, Ana Maria de Castro.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. ISSN: 0103-846X. Fator de impacto: 1.139 (Será submetido)

**PRIMEIRO ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E
FENOTÍPICA DE *Toxoplasma gondii* ISOLADOS DE GALINHAS CAIPIRAS
NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA, GOIÁS, REGIÃO
CENTRO-OESTE, BRASIL**

Hanstter Hallison Alves Rezende¹, Jaqueline Ataíde Silva Lima¹, Antônio Roberto Gomes-Júnior¹, Jade de Oliveira Melo¹, João Luís Garcia², Heloísa Ribeiro Storchilo¹, Taynara Cristina Gomes¹, Marina Clare Vinaud¹, Ana Maria de Castro¹.

1. Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás.
2. Laboratório de Protozoologia Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as características genotípicas e fenotípicas de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos a partir de galinhas caipiras na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás, Região Centro-Oeste, Brasil. A soroprevalência das galinhas analisadas por hemaglutinação (HAI) foi de 96 %. A detecção do DNA de *T. gondii* nos tecidos (cérebro e coração) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), demonstrou 64 % de positividade. Foram realizados bioensaios em camundongos com as amostras de tecidos das galinhas soropositivas, sendo obtidos 15 isolados, oito com características de toxoplasmose aguda apresentando taquizoítos e sete apresentando cistos cerebrais, caracterizando toxoplasmose crônica. A determinação dos genótipos dos isolados de *T. gondii* foi realizada por PCR-RFLP, utilizando seguintes marcadores: SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt. SAG2, Apico e CS3, foi possível definir nove genótipos, sendo sete classificados como ToxoDB #65 e dois ainda não descritos, demonstrando que os isolados obtidos na Região Metropolitana de Goiânia, apresentaram alta variabilidade e diversidade genética. Ao analisar as características fenotípicas, observamos isolados virulentos e com virulência intermediária, mesmo pertencendo ao mesmo genótipo. Foi possível observar que os isolados também se diferenciam morfometricamente, demonstrando que mesmo dentro do mesmo genótipo há diferenças fenotípicas. Portanto, existe alta

prevalência de *T. gondii* em galinhas caipiras, com alta diversidade e variabilidade genética, com características fenotípicas diferentes entre si. Fica evidente a necessidade de boas práticas no preparo da carne do animal para consumo humano, além da implementação de medidas preventivas para evitar o contato das galinhas com gatos nas propriedades.

Palavras-chave: Toxoplasmose, galinhas caipiras, bioensaio, genotipagem, RFLP-PCR, diversidade genética, virulência.

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular do filo Apicomplexa, de distribuição mundial, possui como hospedeiro definitivo os felídeos e inúmeros hospedeiros intermediários, como mamíferos e aves (DUBEY et al., 2013). O gato errante é o principal responsável pela perpetuação do parasito no meio ambiente, pois eliminam oocistos que podem permanecer viáveis mesmo em condições adversas (WEBSTER, 2010). Em Goiânia, a taxa de eliminação de oocistos é de 13,6 % e soroprevalência de anticorpos de 64 %, um valor elevado quando comparado a outras regiões do mundo (REZENDE et al., 2015a).

As galinhas (*Gallus gallus*) caipiras são consideradas indicadoras de contaminação ambiental por se alimentarem diretamente no solo, estando assim constantemente expostas à oocistos (DUBEY et al., 2003a; ZHU et al., 2008; MILLAR et al., 2012). Humanos podem se infectar com as galinhas caipiras através da alimentação e manipulação da carne, principalmente nas propriedades rurais onde são criadas de forma extensiva (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2009). A soropositividade de anticorpos em galinhas, que varia de 10,3 % a 100 % (GARCIA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009). Em Goiás, a prevalência foi de 16,5 % na região oeste do estado (NETO et al., 2014), e na região metropolitana de Goiânia em galinhas caipiras comercializadas em feiras livres de 50 % (ALVES, 2007) e galinhas caipiras de 38% (NETO, 2013).

Indivíduos infectados por *T. gondii* são geralmente assintomáticos, porém, a toxoplasmose pode se manifestar clinicamente em crianças infectadas congenitamente e em indivíduos imunocomprometidos (DUBEY; JONES, 2008; MURAT et al., 2013). No entanto, a patogenicidade é dependente de vários fatores, que incluem a

suscetibilidade do hospedeiro, virulência do isolado e o tempo de infecção (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Em Goiânia, 34,2 % das gestantes estão sob risco de adquirem a infecção com uma taxa de soroconversão de 8,6 % (AVELINO et al., 2003).

Os estudos de caracterização molecular do *T. gondii* realizados com isolados da América do Norte e Europa demonstraram baixa variabilidade genética com três tipos clonais: I, II e III (HOWE; SIBLEY, 1995). Isolados do tipo I foram classificados como altamente letais para camundongos, independente do inóculo. Enquanto os isolados tipo II e III possuíam uma letalidade menor (SIBLEY et al., 2009). Na América do Sul, a diversidade genética foi evidenciada ao analisar inúmeros isolados de diferentes hospedeiros em várias localidades dos países, através da realização de estudos com análises de polimorfismos de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição pela reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR), estes trabalhos demonstraram que o parasito é altamente diversificado geneticamente, não devendo ser considerado um clone como anteriormente descrito, principalmente pela detecção de cepas atípicas, que não pertencem aos tipos clonais (BRANDÃO et al., 2006; LEHMANN et al., 2006; PENA et al., 2008).

A partir dos resultados obtidos dos isolados do Brasil, foram definidas as linhagens clonais típicas do Brasil, que foram classificadas em BrI, BrII, BrIII e BrIV, sendo diferentes dos tipos clássicos de acordo com sua virulência. Dessa forma, os genótipos foram classificados como: BrI virulento, BrIII avirulento, enquanto os genótipos BrII e BrIV com virulência intermediária. A virulência foi determinada pela mortalidade de camundongos, em virulentas (100 % de mortalidade), intermediárias (>30 % de mortalidade) e avirulentas (<30 % de mortalidade) (PENA et al., 2008). O conhecimento das características fenotípicas e genotípicas de *T. gondii* são necessárias para a compreensão da complexa relação parasito-hospedeiro, pois a determinação da virulência do isolado em camundongos pode prever a infecção em humanos (SARAF et al., 2017).

Portanto, a necessidade da caracterização molecular de isolados de *T. gondii* levou ao primeiro estudo sobre a epidemiologia molecular na Região Metropolitana de Goiânia (RMG), no estado de Goiás. Diante das elevadas taxas de prevalência em humanos e animais, como o gato errante; e que a galinha caipira é um importante

indicador de contaminação ambiental por oocistos, e também serve como fonte tradicional de alimentação para a população. Desta forma, o objetivo deste estudo foi o isolamento e caracterização biológica e molecular de *T. gondii* de galinhas caipiras, por meio da técnica de RFLP-PCR, para uma melhor compreensão da toxoplasmose nessa região.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área do estudo e considerações éticas

O estado de Goiás está localizado na região Centro-Oeste do Brasil, a RMG é composta por 18 municípios (Figura 1), com alto desenvolvimento agropecuário, na produção de aves e gado, horticultura e fruticultura (GOIÂNIA, 2017).

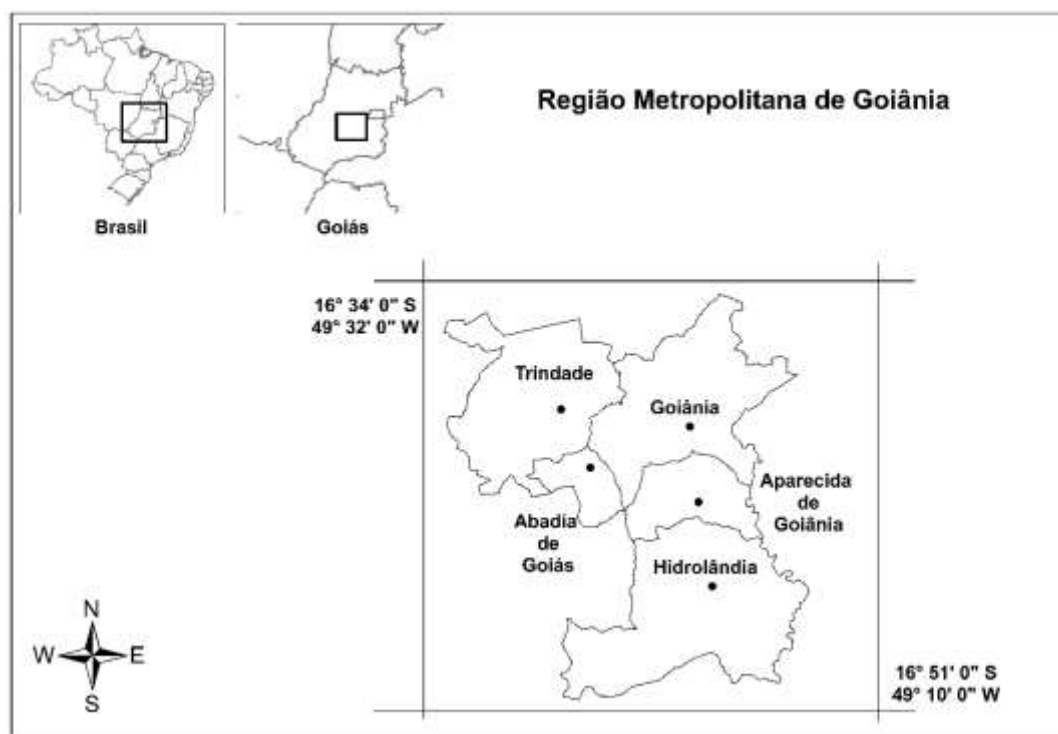


Figura 1: Localidades dos municípios onde foram obtidas galinhas caipiras da Região Metropolitana de Goiânia, no estado de Goiás, Região Centro-Oeste, Brasil.

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás, Brasil (CEUA/UFG), sob o protocolo 024/2016.

2.2 Galinhas caipiras

Cinquenta galinhas criadas de forma extensiva foram adquiridas em propriedades rurais de subsistência nos municípios de Abadia de Goiás (n=10), Aparecida de Goiânia (n=17), Goiânia (n=5), Hidrolândia (n=10) e Trindade(n=8) na RMG, Goiás. Os animais foram selecionados aleatoriamente nas propriedades. As galinhas foram submetidas à eutanásia na própria propriedade, sendo coletada uma amostra de sangue sem anticoagulante por exsanguinação. Após a coleta do sangue, o animal foi decapitado para retirada do cérebro, seguida de necropsia para retirada do coração, com o auxílio de um bisturi estéril.

As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo, sendo enviadas imediatamente ao Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro-LAERPH, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás-IPTSP/UFG. As amostras de sangue foram centrifugadas à 2500 g por 15 minutos para obtenção do soro, e armazenadas a -20 °C até os testes sorológicos serem realizados.

2.3 Sorologia

As amostras de soro foram examinadas através da técnica de hemaglutinação indireta (HAI) pelo *kit* comercial Toxotest WienerLab[®], sendo consideradas reagentes quando apresentaram títulos ≥ 32 . Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos, e as amostras reagentes foram tituladas até o título ≥ 1024 .

2.4 Bioensaio em camundongos

Os cérebros e corações removidos das galinhas soropositivas foram pesados e macerados com o auxílio de um processador doméstico em solução salina a 0,85 %, sendo então realizada a digestão péptica, com pepsina ácida(DUBEY, 1998). O homogenado obtido após a digestão foi tratado com 1000U de penicilina e 200 mg de estreptomicina, sendo inoculado em grupos de três camundongos da linhagem Swiss fêmeas ou machos, na quantidade de 1 mL por via intraperitoneal. Parte do homogenado foi acondicionado em microtubo e armazenado a -80 °C para a extração de DNA.

Os camundongos foram acompanhados diariamente para observação de sinais agudos de toxoplasmose por um período de até 60 dias. Os animais sintomáticos foram sacrificados e realizado o lavado peritoneal com salina 0,85% para observação de taquizoítos entre lâmina e lamínula ao microscópico ótico. Amostras positivas foram acondicionadas em microtubos, armazenados a -80 °C.

Os animais assintomáticos foram eutanasiados, e foi realizada punção cardíaca para obtenção de sangue. As amostras de soro foram examinadas através da técnica de Imunofluorescência indireta (IFI) (CAMARGO, 1964), utilizando conjugado anti-IgG para camundongos Sigma-Aldrich®. Além da análise sorológica, os camundongos foram necropsiados e amostras de cérebro e pulmão foram coletadas. Um pequeno fragmento dos tecidos foi examinado entre lâmina e lamínula para observação de cistos (DUBEY; BEATTIE, 1988). As amostras de tecido positivas foram maceradas em salina estéril, sendo acondicionadas em microtubos, armazenados a -80 °C até a extração de DNA.

2.5 Análise morfométrica dos isolados obtidos

Após o isolamento do parasito foram confeccionadas lâminas a partir do lavado peritoneal de cada isolado que apresentava taquizoítos. As lâminas foram levadas à estufa por um período de 24 horas à 25 °C para secagem. Em seguida foram fixadas e coradas pelo método do Panótico (Instant Prov®).

Os taquizoítos foram fotografados e as imagens analisadas através do programa Image J®, para caracterização morfométrica dos seguintes parâmetros: comprimento longitudinal, largura na altura do núcleo e distância entre núcleo e complexo apical. Estes parâmetros foram avaliados nos isolados e na cepa padrão RH88. Para cada lâmina, foram documentados 100 taquizoítos. As medidas dos isolados foram comparadas com a cepa RH88 através do programa Sigma Stat 3.2, utilizando o teste t. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

2.6 Análise de virulência dos isolados

A análise de virulência foi realizada a partir da inoculação de diferentes diluições de taquizoítos em camundongos da linhagem BALB/c. Foram preparadas diluições de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 taquizoítos/mL. Para cada diluição, foram

inoculados 0,1 mL em cada um dos três camundongos que foram observados diariamente (SARAF et al., 2017). Os animais que não apresentaram sinais clínicos compatíveis com a infecção aguda após um período de 30 dias, foram submetidos a eutanásia, seguida de punção cardíaca para obtenção de amostra de soro para realização da técnica de IFI para observar soroconversão e uma possível infecção crônica (CAMARGO, 1964). Com os resultados dos intervalos de óbito, foram delineadas curvas de virulência de cada isolado e comparadas com a curva da cepa padrão (RH88), para se estabelecer o comportamento biológico do isolado.

As curvas de virulência foram analisadas pela comparação da taxa de sobrevivência entre os camundongos inoculados com os isolados e a cepa padrão RH88. Os gráficos das curvas foram construídos no programa GraphPad Prism® (LOPES et al., 2016).

2.7 Extração de DNA e detecção do *Toxoplasma gondii* por PCR

Foram realizadas extrações de DNA diretamente do homogenado obtido dos tecidos da galinha, dos lavados peritoneais de camundongos com isolados agudos e do macerado de pulmão/cérebro dos camundongos com isolados crônicos. A extração foi realizada utilizando o *kit* comercial BIOPUR®.

As amostras de DNA extraídas foram submetidas às reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 17,3 µL H₂O Mili-Q estéril, 1,0 µL de MgCl₂, 2,5 µL de Tampão 10X (Invitrogen®), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 0,5 mM de cada desoxinucleotídeos (dATP/ dTTP/ dGTP/ dCTP, Sigma®), 50 pmoles de cada iniciador da reação (Invitrogen®) e 2µL de DNA extraído. Os pares de *primers* utilizados foram: Toxo-B5 (5'-TGA AGA GAG GAA ACA GGT GGT CG-3'), Toxo-B6 (5'-CCG CCT CCT TCG TCC GTC GTA-3') (SANTOS; PENA; EPPLEN, 1993).

O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94 °C (5 min), 35 ciclos de desnaturação a 94 °C (1 min), anelamento a 62 °C (1 min) e extensão a 72 °C (1 min) seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

2.8 Avaliação da concordância entre a sorologia por Hemaglutinação e a Reação em Cadeia da Polimerase

Foi realizada a avaliação da concordância entre a positividade detectada pela técnica de HAI e a PCR, por meio do teste X^2 , e também pela avaliação do índice *kappa* que varia de -1 (completo desacordo) a +1 (concordância total)(KRAEMER; BLOCH, 1988).

2.9 Análise molecular

A técnica de RFLP-PCR foi realizada nas amostras de DNA dos isolados agudos e crônicos, utilizando 12 marcadores diferentes: SAG1, 5'-3' SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, APICO, CS3 (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; PENA et al., 2008; DUBEY; SU, 2009). As amostras de arquétipos clonais (Tipo I-GT1, Tipo II-PTG e Tipo III-CTG) e amostras de referência (TgCgCa1, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64, TgRsCr1) foram utilizadas como controles. Os *primers*, as condições de realização da reação, bem como as respectivas enzimas de restrição foram utilizadas de acordo com o marcador específico (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; PENA et al., 2008).

Os resultados obtidos após a eletroforese em gel de agarose foram analisados e os genótipos foram classificados pela plataforma ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). Os genótipos identificados foram combinados com os genótipos controles utilizando o programa SplitsTree(HUSON; BRYANT, 2006).

3. RESULTADOS

3.1 Sorologia e detecção do DNA de *T. gondii* nos tecidos das galinhas caipiras

Do total de 50 galinhas caipiras analisadas, 96 % (48/50) foram positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Os títulos de anticorpos variaram de 32 a ≥ 1024 , sendo que 42 % (21/50) apresentaram título 64. Para detecção molecular do parasito no tecido das galinhas, foi realizada a PCR a partir do homogenado, sendo possível detectar o DNA em 64 % (32/50) dos animais. A comparação entre a sorologia por HAI e a PCR demonstrou concordância fraca entre as técnicas ($k=0,137$) (Tabela 1).

Tabela 1: Razão das diferenças do número de galinhas positivas e negativas nos testes de Hemaglutinação Indireta (HAI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Galinhas	HAI Positivo	HAI Negativo	TOTAL
PCR Positiva	32	0	32
PCR Negativa	16	2	18
Total	48	2	50

χ^2 : 3,70 ($p = 0,054$)

$Kappa = 0,137$; Concordância Fraca.

3.2 Isolamento de *Toxoplasma gondii* a partir de tecidos de galinhas caipiras

Foram realizados 48 bioensaios com amostras de tecidos de galinhas positivas pela técnica HAI, obtendo-se 15 isolados (31,3%), sendo que oito apresentavam taquizoítos provenientes de camundongos com toxoplasmose aguda, e sete isolados foram obtidos de camundongos assintomáticos contendo cistos cerebrais, caracterizando toxoplasmose crônica.

3.3 Análise fenotípica dos isolados de *Toxoplasma gondii*

A análise morfométrica dos isolados que apresentavam taquizoítos em comparação com a cepa padrão RH88 demonstrou diferença significativa em pelo menos uma das variáveis analisadas. Não foi realizada a análise morfométrica e a análise de virulência do isolado TgCkBrGO08, pois nas primeiras passagens do isolado para manutenção em cobaia o isolado perdeu a capacidade de infectar novos animais e não foram realizadas lâminas para avaliação morfometria (Tabela 2).

Na avaliação da virulência, quatro isolados foram caracterizados como virulentos (TgCkBrGO05, TgCkBrGO06, TgCkBrGO10 e TgCkBrGO13) pois apresentaram 100% de mortalidade com o inóculo de 10^2 taquizoítos (Figura 2). Três isolados (TgCkBrGO02, TgCkBrGO04 e TgCkBrGO09) foram caracterizados com virulência intermediária (Figura 3).

Tabela 2: Análise morfométrica dos isolados de *Toxoplasma gondii* em comparação com a cepa padrão RH88, realizada pelo programa ImageJ®.

Isolado	Distância núcleo-complexo apical (µm)	Comprimento (µm)	Largura (µm)
Cepa RH88	2,29 ± 0,76	10,42 ± 1,13	2,12 ± 0,31
TgCkBrGO02	2,67 ± 0,63	10,09 ± 1,23	2,26 ± 0,38*
TgCkBrGO04	3,06 ± 0,69*	10,81 ± 1,13	2,24 ± 0,40*
TgCkBrGO05	2,67 ± 0,56*	10,50 ± 1,25	2,14 ± 0,40
TgCkBrGO06	3,04 ± 0,42	10,85 ± 0,60	2,19 ± 0,19*
TgCkBrGO09	2,59 ± 0,58	9,89 ± 0,94	2,26 ± 0,27*
TgCkBrGO10	2,50 ± 0,65*	10,76 ± 0,86	2,18 ± 0,32
TgCkBrGO13	2,50 ± 0,72*	9,72 ± 1,08*	2,03 ± 0,30

Os valores representam média ± desvio padrão de medidas

* $p \leq 0,05$ (Teste t) comparando as cepas isoladas com a cepa padrão RH88.

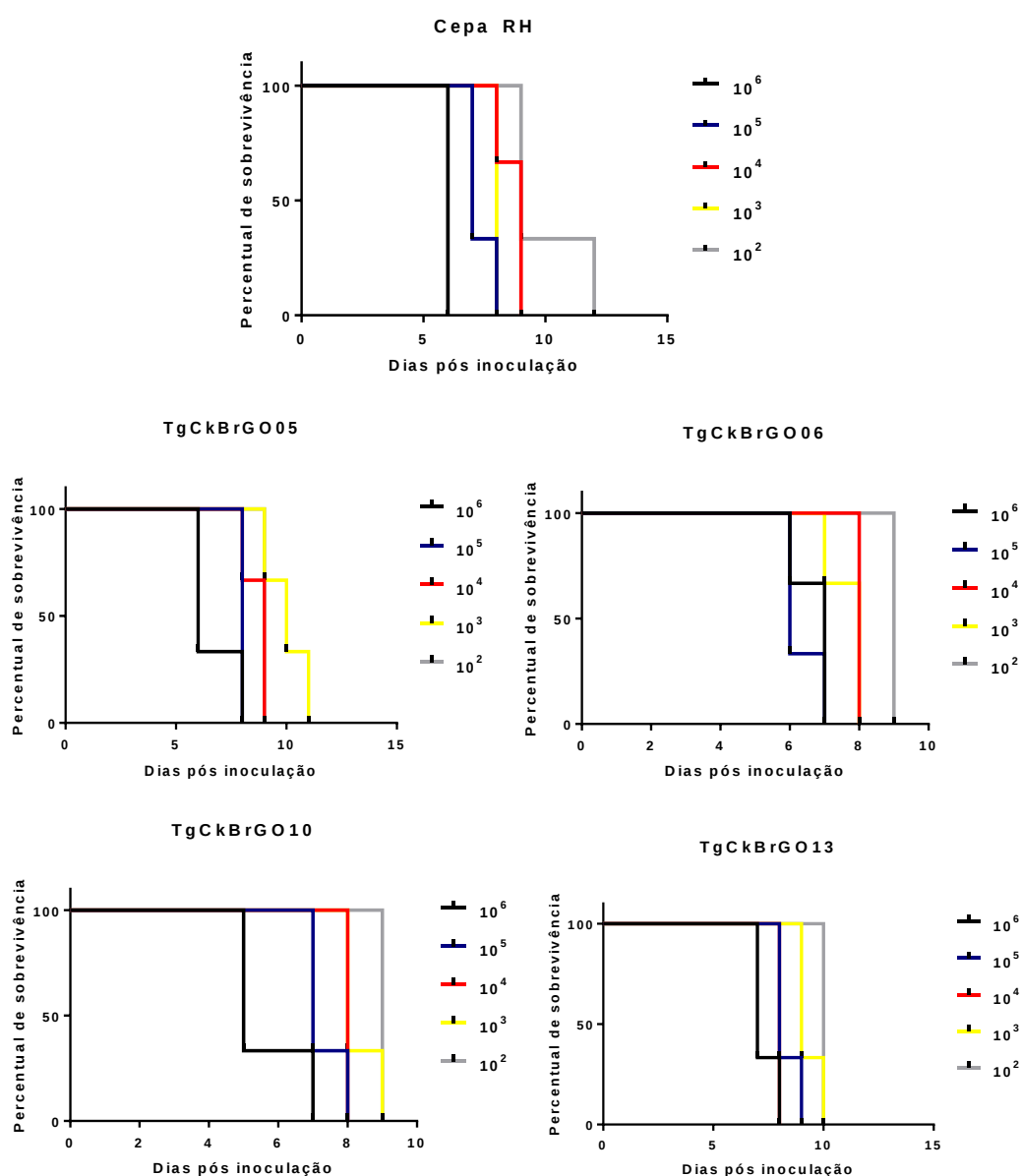


Figura 2: Mortalidade de camundongos BALB/c inoculados via intraperitoneal com diferentes concentrações de taquizoítos dos isolados virulentos: TgCkBrGO05, TgCkBrGO06, TgCkBrGO10, TgCkBrGO13 e cepa padrão RH88.

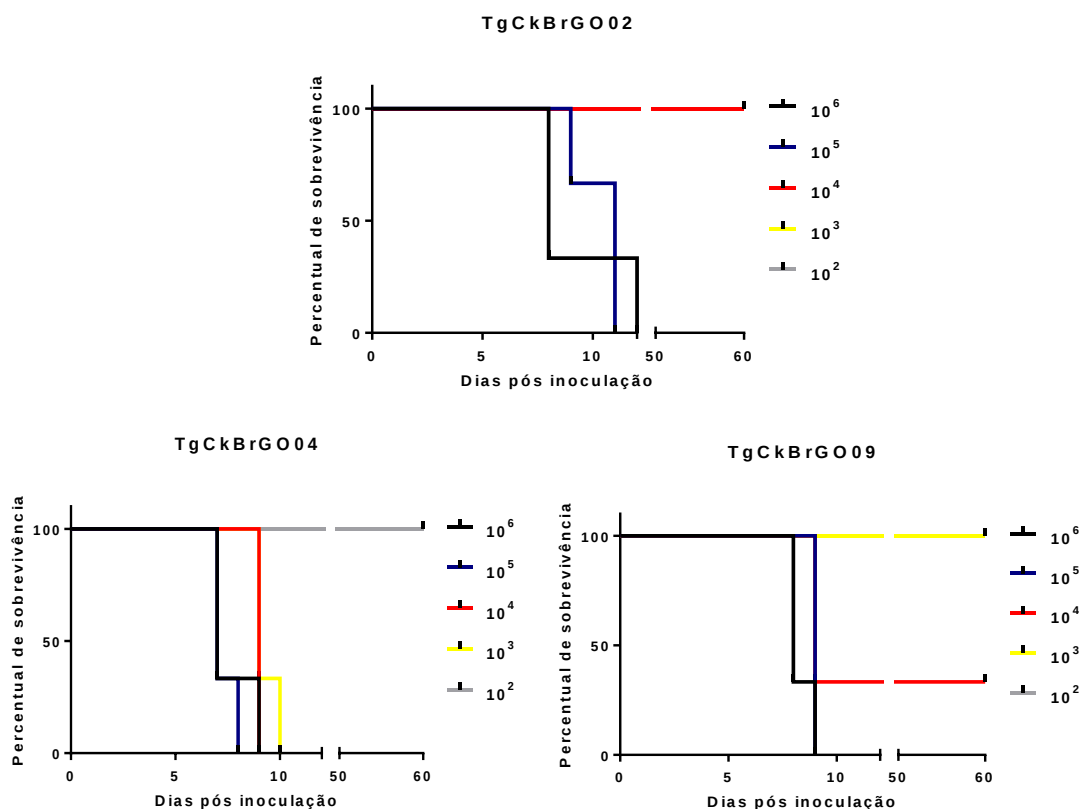


Figura 3: Mortalidade de camundongos BALB/c inoculados via intraperitoneal com diferentes concentrações de taquizoítos dos isolados classificados como virulentos intermediários TgCkBrGO02, TgCkBrGO04 e TgCkBrGO09.

3.4 Análise genotípica dos isolados de *Toxoplasma gondii*

A caracterização genotípica foi realizada nos 15 isolados, e estão descritas na tabela 3. Porém foi possível a conclusão de nove isolados. Sete isolados correspondem ao genótipo #65 do ToxoDB e observou-se dois isolados não haviam sido descritos na literatura anteriormente.

Tabela 3: Caracterização genotípica dos isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas caipiras naturalmente infectadas na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás.

Isolados	MARCADOR												
	SAG1	5-3SAG2	alt.SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3	Genótipo ToxoDB
TgCkBrGO01	I	I	ND	III	ND	III	ND	ND	ND	III	I	ND	ND
TgCkBrGO02	I	I	II	III	III	III	u1	I	I	III	I	II	#65
TgCkBrGO03	I	I	ND	III	ND	III	ND	ND	I	III	I	ND	ND
TgCkBrGO04	I	I	II	III	III	III	u1	I	I	III	I	II	#65
TgCkBrGO05	I	I	II	III	III	III	u1	I	I	III	I	II	#65
TgCkBrGO06	I	I	I	III	II	III	I	I	I	III	I	II	NEW1
TgCkBrGO07	I	ND	ND	III	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	II	ND
TgCkBrGO08	I	I	II	III	III	III	u1	I	I	III	I	II	#65
TgCkBrGO09	I	I	II	III	III	III	u1	I	I	III	I	II	#65
TgCkBrGO10	I	I	II	III	III	III	u1	I	I	III	I	II	#65
TgCkBrGO11	I	I	III	III	ND	III	ND	u-1	ND	III	III	II	ND
TgCkBrGO12	I	I	II	II	I	III	u-1	u-1	III	I	I	III	NEW2
TgCkBrGO13	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	#65
TgCkBrGO14	I	I	ND	III	ND	III	I	ND	II	III	ND	ND	ND
TgCkBrGO15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Não determinado

A árvore filogenética construída usando o SliptsTree mostra a grande diversidade entre os isolados obtidos, e também o distanciamento dos arquétipos clonais (Figura 4).

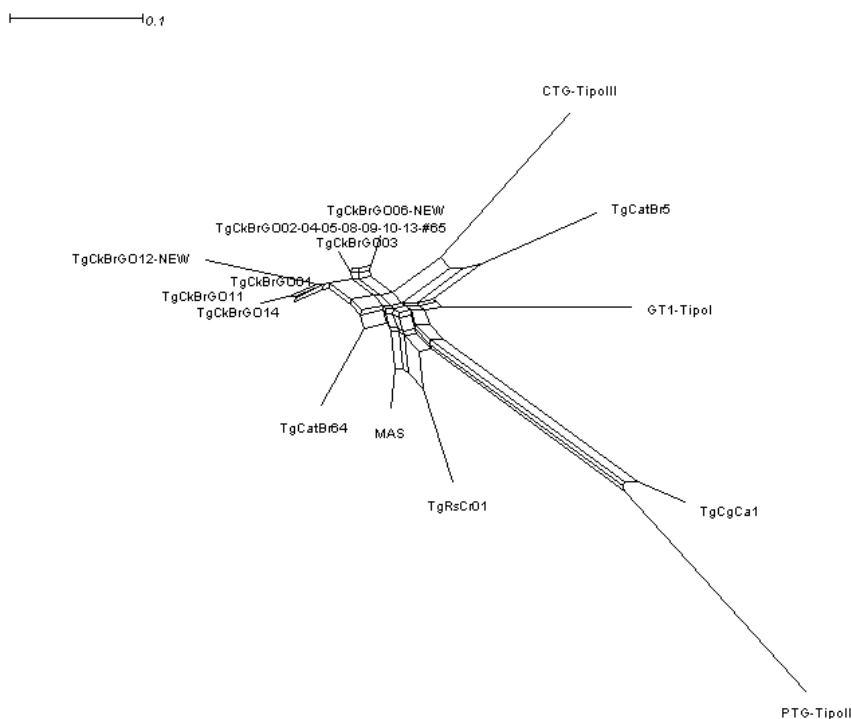


Figura 4: Árvore filogenética dos isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras naturalmente infectadas na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás. Foram incluídos os genótipos de referência (GT1 = tipo I, PTG = tipo II, CTG = tipo III, além dos genótipos atípicos MAS, TgCatBr5, TgCatBr64, TgCgCa1 e TgRsCr1).

4. DISCUSSÃO

Uma elevada frequência de galinhas caipiras soropositivas para *T. gondii* foi observada nesse estudo (96 %), quando comparada com estudos realizados em Goiás, em que a prevalência variou de 16,5 % a 50 % em galinhas criadas de forma extensiva (ALVES, 2007; NETO, 2013; NETO et al., 2014). Na região Centro-Oeste no estado de Mato Grosso do Sul, foi detectada prevalência de 67,5 % (SILVEIRA, 2009); em outras regiões do país, na região Nordeste em Fernando de Noronha 88,4% (MAGALHÃES et al., 2016); na região Sul no estado do Rio Grande do Sul 74,4% (CAMILLO et al., 2015), na região Sudeste em Minas Gerais 71,3% (LOPES et al., 2016), na região Norte no estado de Rondônia foi detectada 66% (DUBEY et al., 2006a). As diferenças nas prevalências pode estar relacionada com o nível de contaminação ambiental por oocistos, diferentes técnicas utilizadas nos inquéritos sorológicos, o sistema de criação, interferentes climáticos, entre outros (MILLAR et al., 2012). Outro fator importante que deve ser ressaltado, apesar de não ser objetivo deste estudo, foi a constatação visual da convivência próxima de gatos e galinhas nas propriedades rurais onde as amostras foram obtidas, o que pode justificar a elevada soroprevalência encontrada nas galinhas analisadas (WEBSTER, 2010; MILLAR et al., 2012).

A avaliação da eficácia das técnicas utilizadas é muito importante para dar credibilidade aos resultados obtidos. Ao se comparar os resultados da PCR com os resultados da HAI, observou-se uma concordância fraca, a diferença pode ter ocorrido pelo fato de que no teste molecular utilizamos o homogenado de cérebro e coração, mesmo sendo considerados órgãos alvos do parasito (AIGNER et al., 2010), a quantidade de parasitos pode ser muito pequena, já sendo relatada a presença de apenas um cisto a cada 100 gramas de tecido, gerando resultados falsos negativos (ALFONSO et al., 2009).

A transmissão de *T. gondii* pode ocorrer por galinhas infectadas durante a manipulação da carcaça e alimentação quando a carne estiver malcozida (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2009). No presente estudo, a amplificação do DNA de *T. gondii* foi possível em 64 % (32/50) das amostras. A detecção do DNA nos tecidos é um achado importante, mesmo não confirmando a viabilidade do parasito no cisto (GUTIERREZ et al., 2010). Mas na ocorrência de viabilidade dos cistos, demonstra a possibilidade de ocorrer infecção, caso haja o consumo da carne ou

vísceras malcozidas, hábito alimentar comum em muitas regiões do Brasil, incluindo o estado de Goiás (MILLAR et al., 2012; FERNANDES et al., 2016).

Dos 48 bioensaios realizados, foram obtidos 15 isolados, perfazendo uma positividade de isolamento de 31,3 %, em outros trabalhos de isolamento a partir de tecidos de galinhas a taxa variou entre 28,05 % a 100 % (DUBEY et al., 2007; TREVISANI et al., 2017). A diferença do isolamento pode estar relacionada com o tipo de tecido utilizado e também a realização do macerado e inoculação dos órgãos separadamente, o que pode elevar a taxa de isolamento (DUBEY et al., 2007; BELTRAME et al., 2012).

A genotipagem foi realizada em nove dos 15 isolados, sendo que nenhum dos isolados pertence aos tipos clonais I, II ou III. Demonstrando alta variabilidade genética nos isolados estudados, que pode também ser observado pelo distanciamento na árvore filogenética dos arquétipos clonais (Figura 3). Foram identificados dois novos genótipos, e sete genótipos foram definidos como ToxoDB #65 (Tabela 3). O genótipo #65 já foi identificado em galinhas no Rio de Janeiro (DUBEY et al., 2003a), em pombos no Paraná (BARROS et al., 2014), em porcos em Pernambuco (SAMICO-FERNANDES et al., 2015) e em gatos em São Paulo (PENA et al., 2006). Em humanos, o genótipo foi detectado em São Paulo, em casos de coriorretinite e encefalite toxoplásmica (FERREIRA et al., 2011). Demonstrando a circulação do genótipo entre vários hospedeiros e com ampla distribuição geográfica.

Avaliando as características fenotípicas dos isolados, mesmo aqueles que foram caracterizados como sendo do mesmo genótipo #65, observamos diferença no padrão de virulência. Dos sete isolados, três foram classificados como virulentos (TgCkBrGO05, TgCkBrGO10 e TgCkBrGO13) e três classificados como virulentos intermediários (TgCkBrGO02, TgCkBrGO04, TgCkBrGO09). Além das diferenças de virulência, os isolados diferiram na análise morfométrica, seja na distância núcleo-complexo apical, comprimento ou largura (Tabela 2). Com essas características observadas sugere-se que mesmo dentro de um único genótipo há diferenças fenotípicas. Informação semelhante foi encontrada na China ao se avaliar o comportamento fenotípico do genótipo #9 (Chinês 1) (WANG et al., 2013).

O isolado TgCkBrGO06 (NEW1) foi classificado como virulento, os camundongos desse isolado apresentaram anorexia, taquicardia e paralisia de membros inferiores. O isolado TgCkBrGO12 (NEW2) induziu a formação de cistos teciduais, não levando a morte dos camundongos. A identificação desses isolados

demonstra que ainda podem existir diversos genótipos presentes no ambiente que ainda são totalmente desconhecidos, de forma que não se sabe o real risco de infecção tanto de animais quanto de humanos.

5. CONCLUSÃO

A alta frequência de animais positivos no presente estudo deve ser uma preocupação para as autoridades de saúde, pois demonstra um ambiente altamente contaminado com oocistos na região. Os isolados obtidos demonstram alta variabilidade e diversidade genética do parasito na região, sendo identificados dois genótipos ainda não descritos, dado que reforça a alta diversidade do parasito em nossa região.

Diferenças fenotípicas foram observadas em análises morfométricas e de mortalidade em camundongos, que podem ser consideradas como diferenças na clínica apresentada em infecções nos seres humanos. Sendo muito importante a avaliação biológica em isolados, além de apenas realizar a definição de genótipos.

Além disso, o estudo demonstra que existe o risco de transmissão do *T. gondii* aos seres humanos, pelo consumo da carne de galinha caipira fazer parte da alimentação tradicional goiana. Com base nos resultados, devem ser adotadas medidas preventivas, como evitar que os gatos tenham acesso às criações de galinhas, medidas de saneamento ambiental, introduzir alimentação a base de rações para as galinhas, e orientação a respeito do cozimento adequado e boas práticas alimentares.

6. CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse.

7. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás (FAPEG) pela concessão da bolsa de doutorado a H. H. A. Rezende (Chamada 03/2016).

8. REFERÊNCIAS

AIGNER, C. P.; DA SILVA, A. V. Da; SANDRINI, F.; OSÓRIO, P. de S.; POIARES, L.; LARGURA, A. Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in

tissue samples of serologically positive outdoor chickens. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 935–937, 2010.

ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; JIMÉNEZ, N.; FONSECA, C.; DORTA-CONTRERAS, A. J.; COX, R.; CAPÓ, V.; BANDERA, F.; POMIER, O.; GINORIO, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid

identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. **Experimental parasitology**, v. 122, n. 3, p. 203–7, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318095>>.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; TORRES-CASTORENA, A.; LIESENFELD, O.; GARCÍA-LÓPEZ, C. R.; ESTRADA-MARTÍNEZ, S.; SIFUENTES-ÁLVAREZ, A.; MARSAL-HERNÁNDEZ, J. F.; ESQUIVEL-CRUZ, R.; SANDOVAL-HERRERA, F.; CASTAÑEDA, J. A.; DUBEY, J. P. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women in Rural Durango, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 271–274, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE1829.1>>.

ALVES, E. da C. *Toxoplasma gondii*: soroprevalência, isolamento e virulência de cepas obtidas de galinhas caipiras (*Gallus gallus*) comercializadas em feiras livres do município de Goiânia. 2007. Universidade Federal de Goiás, 2007. Disponível em: <<https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/EduardoCostaII-2007.pdf>>.

AVELINO, M. M.; CAMPOS, D.; PARADA, J. C. B. de; CASTRO, A. M. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 108, n. 1, p. 19–24, 1 maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694964>>.

BARROS, L. D. de; TARODA, A.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L. da; SAMMI, A. S.; CARDIM, S. T.; MIURA, A. C.; SU, C.; MACHADO, R. Z.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 23, n. 4, p. 443–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517521>>http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000400443&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

BELTRAME, M. A. V.; PENA, H. F. J.; TON, N. C.; LINO, A. J. B.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; PEREIRA, F. E. L. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 225–230, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.053>>.

BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. A. Characterization of *Toxoplasma gondii* From Domestic Animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, p. 143–149, 2006.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**

de Sao Paulo, v. 6, p. 117–8, 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14177810>>.

CAMILLO, G.; CADORE, G. C.; FERREIRA, M. S. T.; BRAUNIG, P.; MACIEL, J. F.; PIVOTO, F. L.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 2, p. 263–265, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516635X2015000200263&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

DUBEY, J. .; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. CRC Press ed. [s.l: s.n.]

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.; CHOUDHARY, S.; TILAHUN, G.; TIAO, N.; GEBREYES, W. A.; ZOU, X.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 1–2, p. 206–8, 1 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411374>>.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; VIANNA, M. C. B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C. B. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Source Journal of Parasitology J. Parasitol**, v. 92, n. 1, p. 36–40, fev. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-655R.1>>.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; SEIPEL, D.; SILVA, D.; LEHMANN, T.; BAHIAOLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondii* Isolates of Free-Ranging Chickens From Rio de Janeiro, Brazil: Mouse Mortality, Genotype, and Oocyst Shedding by Cats. **J. Parasitol**, v. 89, n. 4, p. 851–853, 2003.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–78, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508057>>.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: What's out and where did they come from. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190–195, 2009.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. da 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, 2007.

DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1403–1410, dez. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457912002225>>.

FERNANDES, M. F. T. S.; CAVALCANTI, E. F. T. S. F.; SILVA, J. G. da; MOTA, A. da R.; SOUZA NETO, O. L. de; SANTOS, A. de S.; ALBUQUERQUE, P. P. F. de; LIMA, D. C. V. de; MOTA, R. A. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in backyard chicken breeding in Northeast, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 105–108, mar. 2016. Disponível em: <www.cbpv.org.br/rbpv>.

FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; DE MATTOS, C. de C. B.; DE MATTOS, L. C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP–PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 190–195, out. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489411001767>>.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; MARANA, E. R. M. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 123–127, mar. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782000000100020&lng=pt&tlng=pt>.

GOIÂNIA, P. de. **Região Metropolitana**. Disponível em: <<https://www.goiania.go.gov.br/html/principal/goiania/regiao metropolitana/regiao metropolitana.shtml>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

GUTIERREZ, J.; O'DONOVAN, J.; WILLIAMS, E.; PROCTOR, A.; BRADY, C.; MARQUES, P. X.; WORRALL, S.; NALLY, J. E.; MCELROY, M.; BASSETT, H.; SAMMIN, D.; BUXTON, D.; MALEY, S.; MARKEY, B. K. Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR. **Veterinary parasitology**, v. 172, n. 1–2, p. 8–15, 27 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510517>>.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561–6, dez. 1995. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/30134669>>.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–67, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16221896>>.

KRAEMER, H. C.; BLOCH, D. A. Kappa coefficients in epidemiology: an appraisal of a reappraisal. **Journal of clinical epidemiology**, v. 41, n. 10, p. 959–68, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3193139>>.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11423–11428, 25 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601438103>>.

LOPES, C. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; SILVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865–1875, 8 jul. 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268815003295>.

MAGALHÃES, F. J. R.; DA SILVA, J. G.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; PINHEIRO, J. W.; APARECIDO MOTA, R. High prevalence of toxoplasmosis in free-range chicken of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Acta Tropica**, v. 159, p. 58–61, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.034>>.

MILLAR, P. R.; ALVES, F. M. X.; TEIXEIRA, V. Q.; VICENTE, R. T.; MENEZES, E. M.; SOBREIRO, L. G.; DE ALMEIDA PEREIRA, V. L.; AMENDOEIRA, M. R. R. Occurrence of infection with *Toxoplasma gondii* and factors associated with transmission in broiler chickens and laying hens in different raising systems. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 231–236, 2012.

MURAT, J.-B.; HIDALGO, H. F.; BRENIER-PINCHART, M.-P.; PELLOUX, H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 9, p. 943–56, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053275>>.

NETO, O. J. S. **PERFIL SOROEPIDEMIOLÓGICO E DETECÇÃO MOLECULAR DE**. 2013. Universidade Federal de Goiás, 2013.

NETO, O. J. S.; TAVEIRA, R. Z.; AMARAL, A. das G.; OLIVEIRA, B. C. de; NASCIMENTO, E. de P. B. AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM GALINHAS DE POSTURA CAIPIRAS CRIADAS NA REGIÃO DO OESTE GOIANO. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 10, n. 18, p. 510–516, 2014.

OLIVEIRA, L. N.; COSTA JUNIOR, L. M.; DE MELO, C. F.; RAMOS SILVA, J. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; AZEVEDO, S. S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO, D. a F. V.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 95, n. 1, p. 235–7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18578589>>.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–569, abr. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751907003359>>.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. 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, ago. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528805001694>>.

REZENDE, H. H. A.; AVELAR, J. B.; STORCHILO, H. R.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. De. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the

diagnosis of intestinal parasites in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 471–474, dez. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S198429612015000400471&lng=en&tlng=en>.

SAMICO-FERNANDES, E. F. T.; DE MELO, R. P. B.; DE CÁSSIA PEIXOTO KIM, P.; DE ALMEIDA, J. C.; DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; DA SILVA, J. C. R.; MOTA, R. A. First report of genotype #65 of *Toxoplasma gondii* in pigs. **Parasitology research**, v. 114, n. 10, p. 3927–30, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26268568>>.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Ylinked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetics**, v. 90, n. 6, fev. 1993. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00202486>>.

SARAF, P.; SHWAB, E. K.; DUBEY, J. P.; SU, C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental parasitology**, v. 174, n. 3, p. 25–30, mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350221>>.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749–2761, 27 set. 2009. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2009.0087>>.

SILVEIRA, L. H. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul**. 2009. Universidade de São Paulo, 2009.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841–848, jun. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751906001056>>.

TREVISANI, N.; BARROS, L. D.; VIEIRA-NETO, A.; SARTOR, A. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, J. L.; MOURA, A. B. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from naturally infected *Gallus domesticus* in Santa Catarina state, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 69, n. 1, p. 139–145, 2017.

WANG, L.; CHEN, H.; LIU, D.; HUO, X.; GAO, J.; SONG, X.; XU, X.; HUANG, K.; LIU, W.; WANG, Y.; LU, F.; LUN, Z.-R.; LUO, Q.; WANG, X.; SHEN, J. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53483, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308233>>.

WEBSTER, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” Tby J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 112, 2010. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-112>>.

ZHU, J.; YIN, J.; XIAO, Y.; JIANG, N.; ANKARLEV, J.; LINDH, J.; CHEN, Q. A seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 360–363, dez. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708004809>>.

ARTIGO 2 – Será submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária
Elevada soroprevalência e detecção por PCR de *Toxoplasma gondii* em gatos errantes em Goiânia, Goiás, Brasil.

Hanstter Hallison Alves Rezende¹, Jaqueline Ataíde Silva Lima¹, Antônio Roberto Gomes-Júnior¹, Jade de Oliveira Melo¹, Heloísa Ribeiro Storchilo¹, Taynara Cristina Gomes¹, Marina Clare Vinaud¹, Ana Maria de Castro¹.

1. Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e de DNA do parasito em gatos errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia, Goiás. Para a análise dos anticorpos foi utilizada a técnica de Hemaglutinação Indireta (HAI) e para a pesquisa de DNA foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com *primers* que amplificam o gene B1 em amostras de cérebro, músculo e coração dos gatos. A análise sorológica identificou 87,4% (21/24) de animais soropositivos e a análise molecular identificou 75% (18/24). A elevada taxa de detecção sorológica e molecular são aspectos preocupantes em saúde pública, pois comprova o importante papel desses animais na contaminação ambiental e consequentemente pela transmissão da toxoplasmose para o ser humano.

Palavras-chave: Toxoplasmose, gatos errantes, Hemaglutinação Indireta, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), gene B1.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, o parasito possui como hospedeiro definitivo o gato doméstico e felídeos silvestres; e como hospedeiros intermediários diversos mamíferos e aves, incluindo o homem (DUBEY et al., 2013).

O gato pode eliminar milhões de oocistos com suas fezes em regiões urbanizadas, por esse motivo, os gatos errantes que defecam em vias públicas são importantes na perpetuação e transmissão do parasito nas cidades. Tanto gatos jovens e adultos podem reagudizar, com a eliminação de oocistos, principalmente quando

coinfectados pelo vírus da imunodeficiência felina (BROWN et al., 2003; WEBSTER, 2010)

São vários os mecanismos de transmissão de *T. gondii*, entre elas se destaca a infecção adquirida que ocorre principalmente pela ingestão acidental de oocistos esporulados através de água e/ou alimentos contaminados; através do consumo de carnes cruas e/ou malcozidas ou embutidos (DUBEY, 2008; WEBSTER, 2010). A forma adquirida está relacionada principalmente com hábitos alimentares, podendo ser adquirida nos primeiros anos de vida (REZENDE et al., 2017).

Em Goiânia há uma alta prevalência de toxoplasmose em humanos, em inquéritos realizados foram detectadas 51,85 % de mães cronicamente infectadas em duas maternidades públicas de referência do município (AVELAR, 2013). Ao analisar 10.316 triadas pelo teste da mamãe foi demonstrada uma prevalência de 67,7 % de mães IgG positivas e 32,2 % soronegativas que estão sob risco de adquirirem a infecção (SARTORI et al., 2011).

São poucos os artigos sobre a soroprevalência e a taxa de eliminação de oocistos pelos gatos. Na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás foi descrito por REZENDE (2015) que 13,6 % dos gatos errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses estavam eliminando oocistos de *T. gondii* (REZENDE et al., 2015b) e uma soroprevalência em gatos de 64 % (REZENDE, 2015).

O presente estudo teve como objetivo verificar a soropositividade para anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro e detecção de DNA em tecidos de gatos errantes capturados pelo CCZ, durante o ano de 2016.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais desta pesquisa foram realizados de acordo com Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Goiás, Brasil (CEUA/UFG), sob o protocolo 024/2016 (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2015).

Descrição do grupo de estudo

Foram analisados 24 gatos errantes oriundos do CCZ, da Secretaria Municipal

de Vigilância Epidemiológica de Goiânia, Goiás. Os quais foram capturados pela equipe do CCZ, durante o ano de 2016. Por motivos operacionais não foi possível determinar a localização de captura dos animais. Ressaltamos que os animais foram condenados por estarem doentes, já que os animais saudáveis são encaminhados à adoção e aos abrigos de animais.

Obtenção das amostras biológicas

Os animais condenados à eutanásia foram anestesiados pelo médico veterinário do CCZ com superdosagem de tiopental sódico, que ocasionava a morte do animal. Em seguida foi coletada uma amostra de 3 mL de sangue por punção intracardíaca, sendo acondicionada em um tubo estéril sem anticoagulante. O cadáver foi necropsiado, sendo retiradas amostras de cérebro, coração e tecido muscular da coxa. Os tecidos foram acondicionados em sacos plásticos e colocados em uma caixa com gelo.

As amostras de sangue e tecido foram encaminhadas ao Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (LAERPH/IPTSP-UFG). A amostra de sangue foi centrifugada a 2500 g por 15 minutos para obtenção da amostra de soro. As amostras de tecido de cada gato foram cortadas com um auxílio de um bisturi estéril, e homogenizadas através de um processador doméstico, o *pool* de tecidos foi armazenado em microtubos, sendo armazenados a -20°C para posterior extração de DNA.

Realização da Hemagluinação Indireta (HAI)

As amostras de soro foram examinadas através da técnica de hemaglutinação indireta (HAI) pelo *kit* comercial Toxotest WienerLab[®], sendo consideradas reagentes as amostras que apresentaram títulos ≥ 32 . Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos, e as amostras reagentes foram tituladas até o título ≥ 1024 .

Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas extrações de DNA do *pool* de tecidos através do protocolo para extração de tecidos do *kit* comercial BIOPUR[®]. As amostras de DNA extraído a partir dos homogenizados foram submetidas a PCR do gene B1. As reações em cadeia

da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 17,3 µL H₂O Mili-Q estéril, 1,0 µL de MgCl₂, 2,5 µL de Tampão 10X (Invitrogen®), 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®), 0,5 mM de cada desoxinucleotídeos (dATP/ dTTP/ dGTP/ dCTP, Sigma®), 50 pmoles de cada iniciador da reação (Invitrogen®) e 2µL de DNA extraído. Os pares de *primers* utilizados foram: Toxo-B5 (5'-TGA AGA GAG GAA ACA GGT GGT CG-3'), Toxo-B6 (5'-CCG CCT CCT TCG TCC GTC GTA-3')(SANTOS; PENA; EPPLEN, 1993).

O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94 °C (5 min), 35 ciclos de desnaturação a 94 °C (1 min), anelamento a 62 °C (1 min) e extensão a 72°C (1 min) seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados pela PCR com o tamanho 110pb foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6 % revelados pela prata.

Análise estatística

Foi realizada a avaliação da concordância entre a positividade detectada pela técnica de HAI e a PCR, por meio do teste X^2 , e também pela avaliação do índice *kappa* que varia de -1 (completo desacordo) a +1 (concordância total) (KRAEMER; BLOCH, 1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise sorológica demonstrou que 87,4% (21/24) dos animais possuíam anticorpos anti-*T. gondii*, sendo o título 64 o mais frequente (Tabela 1). A soroprevalência nos gatos errantes foi superior a encontrada por REZENDE (2015) em Goiânia, que havia detectado 64% de positividade. Em outras regiões do Brasil a soroprevalência em gatos também foi alta, na região Norte em Rondônia 87,3% (CAVALCANTE et al., 2006), na região Sul no estado do Paraná a prevalência chegou a 84,4%(DUBEY et al., 2004c). Na região Nordeste em Fernando de Noronha no estado de Pernambuco com 72% (COSTA et al., 2012), na região Sudeste no estado do Rio de Janeiro uma prevalência de 72% (MENDES-DE-ALMEIDA; MATTOS; LABARTHE, 2007). Elevadas soroprevalências sugerem uma alta contaminação ambiental por oocistos (CORNELISSEN et al., 2014).

Tabela 1: Resultado de análise sorológica para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo teste de Hemaglutinação Indireta (HAI) em gatos errantes em Goiânia, Goiás de 2016*.

Título de Anticorpos	Gatos errantes	
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<32	3*	12,5%
32	3	12,5%
64	11	45,8%
128	4	16,6%
256	1	4,2%
512	1	4,2%
≥1024	1	4,2%
Total	24	100%

*Ressaltamos que somente são consideradas reagentes as amostras que apresentaram títulos ≥32

Além dos casos humanos, a prevalência da infecção em gatos chama a atenção, pois já foram detectadas elevadas taxas de oocistos em exames de fezes mesmo em animais adultos, ao analisar 149 amostras de fezes de gatos, 65 amostras de gatos errantes e 84 amostras de gatos domiciliados, foi detectada em amostras de gatos errantes 27,7 % (18/65) e em gatos domiciliados 3,6 % (3/84), demonstrando a importância dos gatos errantes na epidemiologia da toxoplasmose nas cidades(LIMA, 2016).

A análise da presença de DNA do parasito nos tecidos dos gatos foi detectada em 75 % (18/24), a PCR detectou uma amostra que havia sido negativa pela HAI, mas quatro amostras soropositivas foram negativas pela PCR (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação dos resultados do título de anticorpos detectado pela técnica de Hemaglutinação Indireta-HAI em amostras de soro de gatos errantes em Goiânia, Goiás, com os resultados obtidos pelo pool de tecidos pela Reação em Cadeia da Polimerase-PCR

Título de Anticorpos	Gatos errantes		
	Gatos PCR positivas	Gatos PCR negativas	Total
<32	1	2	3
32	3	0	3
64	9	2	11
128	2	2	4
256	1	0	1
512	1	0	1
≥1024	1	0	1
Total	18	6	24

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

A análise de concordância entre a HAI e a PCR através do índice *kappa* demonstrou concordância fraca ($k = 0,189$) (Tabela 3):

Tabela 3: Razão das diferenças do número de gatos positivos e negativos nos testes de Hemaglutinação Indireta (HAI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Gatos	HAI Positivo	HAI Negativo	TOTAL
PCR Positiva	18	1	18
PCR Negativa	4	1	6
Total	23	1	24

$Q^2 : 3,13$ ($p = 0,076$)

Kappa = 0,189; Concordância Fraca.

A diferença entre as técnicas é justificada pelo fato dos testes imunológicos, detectarem anticorpos, e estes estão dissolvidos no soro. Diferente dos moleculares, que são diretamente relacionados com a presença do parasito no material biológico examinado, assim, como descrito na literatura, que a cada 100 gramas de tecido é encontrado apenas um cisto do parasito (ALFONSO et al., 2009; AIGNER et al., 2010).

Em conclusão, o estudo demonstrou elevada prevalência de anticorpos e DNA nos tecidos de gatos errantes capturados pelo CCZ de Goiânia, confirmando o papel desses animais no ciclo de transmissão da infecção nessa região em especial, o que poderia justificar a elevada prevalência em humanos na região metropolitana de Goiânia.

REFERÊNCIAS

- AIGNER, C. P.; DA SILVA, A. V. Da; SANDRINI, F.; OSÓRIO, P. de S.; POIARES, L.; LARGURA, A. Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 935–937, 2010.
- ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; JIMÉNEZ, N.; FONSECA, C.; DORTA-CONTRERAS, A. J.; COX, R.; CAPÓ, V.; BANDERA, F.; POMIER, O.; GINORIO, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. **Experimental parasitology**, v. 122, n. 3, p. 203–7, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318095>>.
- AVELAR, J. B. **Toxoplasmose crônica em gestantes. Avaliação da prevalência, fatores de risco e acompanhamento de um grupo de recém-nascidos em Goiânia – Goiás**. 2013. Universidade Federal de Goiás, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/3483/5/Tese - Juliana Boaventura Avelar - 2013.pdf>>.
- BROWN, R. R.; ELSTON, T. H.; EVANS, L.; GLASER, C.; GULLEDEG, M. L.; JARBOE, L.; LAPPIN, M. R.; MARCUS, L. C. American Association of Feline Practitioners 2003. **Compendium**, v. 25, n. 12, p. 948–96=50, 2003.
- CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D.; DUBEY, J. P.; RUIZ, V. L. A.; DIAS, R. A.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Cats and Pigs From Rural Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 863–864, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-830R.1>>.
- CORNELISSEN, J. B. W. J.; VAN DER GIESSEN, J. W. B.; TAKUMI, K.; TEUNIS, P. F. M.; WISSELINK, H. J. An Experimental *Toxoplasma gondii* Dose Response Challenge Model to Study Therapeutic or Vaccine Efficacy in Cats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e104740, 3 set. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104740>>.
- COSTA, D. G. C.; MARVULO, M. F. V; SILVA, J. S. A.; SANTANA, S. C.; MAGALHÃES, F. J. R.; FILHO, C. D. F. L.; RIBEIRO, V. O.; ALVES, L. C.; MOTA, R. a; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 98, n. 3, p. 679–80, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22150091>>.
- DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–75, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120791>>.
- DUBEY, J. P.; CHOUDHARY, S.; TILAHUN, G.; TIAO, N.; GEBREYES, W. A.; ZOU, X.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 1–2, p. 206–8, 1 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411374>>.

DUBEY, J. P.; PARNELL, P. G.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; DE YOUNG, R. W.; DAHL, E.; LEHMANN, T. Biologic and Molecular Characteristics of *Toxoplasma gondii* Isolates From Striped Skunk (*Mephitis mephitis*), Canada Goose (*Branta canadensis*), Black-Winged Lory (*Eos cyanogenia*), and Cats (*Felis catus*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1171–1174, out. 2004. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-340R>>.

KRAEMER, H. C.; BLOCH, D. A. Kappa coefficients in epidemiology: an appraisal of a reappraisal. **Journal of clinical epidemiology**, v. 41, n. 10, p. 959–68, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3193139>>.

LIMA, J. A. S. **COMPARAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE PARASITOS ENTÉRICOS EM GATOS ERRANTES E DOMICILIADOS EM GOIÂNIA/GOIÁS, ANÁLISE DA ACURÁCIA DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DA COPRO-PCR PARA O DIAGNÓSTICO DE *Toxoplasma gondii***. 2016. Universidade Federal de Goiás, 2016.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; MATTOS, M. M. O.; LABARTHE, N. *Giardia* spp . em amostras fecais de gatos domésticos do Rio de Janeiro , RJ *Giardia* spp . in fecal samples of domestic cats from Rio de Janeiro , RJ. **Acta Scientae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 469–480, 2007.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Normativas do Concea para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2016.

REZENDE, H. H. A. **Prevalência de parasitos intestinais em gatos errantes em Goiânia – Goiás: ênfase no diagnóstico de *Toxoplasma gondii* e avaliação da acurácia de técnicas parasitológicas**. 2015. Universidade Federal de Goiás, 2015.

REZENDE, H. H. A.; AVELAR, J. B.; STORCHILO, H. R.; VINAUD, M. C.; DE CASTRO, A. M. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 24, n. 4, 2015.

REZENDE, H. H. A.; STORCHILO, H. R.; LIMA, J. A. S.; GOMES JÚNIOR, A. R.; GOMES, T. C.; SOUZA, J. Y. de; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N. do; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. de. Nursing infant with acquired toxoplasmosis in the first months of life – a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 2, p. 265–74, 24 ago. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003646652017005000410&lng=en&tlng=en>.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Ylinked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetics**, v. 90, n. 6, fev. 1993. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00202486>>.

SARTORI, A. L.; MINAMISAVA, R.; AVELINO, M. M.; MARTINS, C. A. Triagem pré-natal para toxoplasmose e fatores associados à soropositividade de gestantes em Goiânia, Goiás. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 2, p. 93–98, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v33n2/v33n2a07>>.

WEBSTER, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 112, 2010. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-112>>.

7. DISCUSSÃO/CONSIDERAÇÕES

Na presente tese duas abordagens foram utilizadas para avaliar a prevalência de *T. gondii* na RMG, Goiás, Brasil. A primeira abordagem foi realizada com galinhas caipiras (Artigo 1), em que foi detectada uma elevada soroprevalência em 96 % e uma taxa de detecção molecular do parasito em tecidos dos 74 % dos animais. Em Goiás, estudos anteriores detectaram uma soroprevalência de 16,5 % a 50 % em galinhas criadas de forma extensiva (ALVES, 2007; NETO, 2013; NETO et al., 2014). Durante as coletas foi observada uma aproximação entre o gato e as galinhas, o que é considerado um fator de risco para elevadas soroprevalências (WEBSTER, 2010; MILLAR et al., 2012).

A análise de concordância entre a técnica de HAI, utilizada neste estudo para diagnóstico sorológico, e a PCR, que é um teste parasitológico, apresentou baixa concordância, o que é esperado quando se utiliza tecidos pela baixa concentração de parasitos na amostra, enquanto a sorologia utiliza soro rico em anticorpos (ALFONSO et al., 2009).

Apesar disso, a detecção do DNA em tecidos deve ser considerada como um risco para infecção, caso a carne malcozida seja consumida e não sejam adotadas medidas seguras de manipulação da carcaça (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2009). Haja visto que o consumo da carne de galinha caipira faz parte da alimentação tradicional goiana. Foram obtidos 15 isolados a partir de amostras de tecidos, demonstrando a viabilidade do parasito em 31,3%.

A análise genética por RFLP-PCR foi realizada em nove isolados, demonstrando alta variabilidade genética, pois todos os isolados são atípicos, além disso alta diversidade, sendo sete definidos como o genótipo ToxoDB #65 e dois isolados não descritos. O genótipo #65 foi isolado anteriormente em humanos no estado de São Paulo (FERREIRA et al., 2011) em casos graves de coriorretinite e fatais de encefalite toxoplásmica. O genótipo do isolado pode estar relacionado com a virulência do mesmo (SARAF et al., 2017); testes de virulência foram realizados em camundongos para avaliação da mortalidade, e foi demonstrada virulência elevada e intermediária em isolados do genótipo #65, além disso, diferenças morfométricas também foram observadas.

Isolados pertencentes ao mesmo genótipo podem apresentar diferenças fenotípicas de virulência e morfometria, como demonstrando neste estudo pelo genótipo #65, e anteriormente com o genótipo #9 - Chinês 1 (WANG et al., 2013). Em outros trabalhos em que o genótipo #65 foi identificado, seja em porcos, pombos ou galinhas (DUBEY et al., 2003a; BARROS et al., 2014; SAMICO-FERNANDES et al., 2015); não foram realizadas análises fenotípicas para este genótipo como as realizadas nesta tese.

O encontro de dois genótipos ainda não descritos na literatura demonstra a importância na continuação de estudos de epidemiologia molecular do parasito, pois ainda há genótipos não conhecidos em características genotípicas e tão pouco em fenotípicas.

A segunda abordagem do estudo foi a análise de gatos errantes capturados pelo CCZ em Goiânia (Artigo 2), onde detectou-se uma soroprevalência de 87,7 %, uma elevada soroprevalência sugere alta contaminação ambiental por oocistos (CORNELISSEN et al., 2014), como já foi detectado em Goiânia por REZENDE et al., (2015) em 13,6 % das amostras de fezes de gatos errantes e por LIMA (2016) em 27,7 %, demonstrando que o gato errante é um risco para a transmissão da toxoplasmose nas cidades.

Não foram isolados *T. gondii* a partir dos tecidos dos gatos errantes, mas foi realizada a análise de DNA nos tecidos, sendo detectado em 75 % dos animais, caracterizando mais uma vez a elevada positividade para esses animais. O encontro dos parasitos nos tecidos deve ser considerado um risco, no caso de uma reagudização da doença, o animal poderá re-eliminar oocistos contaminando o ambiente (BROWN et al., 2003; WEBSTER, 2010). Também foi realizada a comparação da HAI com a PCR para diagnóstico do *T. gondii* em gatos, mas a concordância também foi fraca.

Além da contaminação através água e/ou alimentos por oocistos (DUBEY et al., 2008; WEBSTER, 2010), hábitos alimentares como o consumo de carne malpassada também são de grande importância como foi demonstrado no relato de caso de uma criança nos primeiros meses de vida com a infecção adquirida (Anexo 3), além disso foi obtido um isolado do sangue deste paciente, cujo genótipo será definido futuramente.

Em Goiânia há uma alta prevalência de toxoplasmose em humanos, vários estudos foram realizados com gestantes (SARTORI et al., 2011; AVELAR, 2013). Além da elevada soroprevalência, o fato de viver em Goiânia por mais de 12 meses e a baixa escolaridade são fatores de risco para aquisição da toxoplasmose (AVELAR et al., 2018).

Esta tese deixa evidente a relação entre os hospedeiros definitivos, intermediários, humanos e de certa forma o meio ambiente. Os gatos errantes como principais agentes na transmissão do *T. gondii* na RMG, as galinhas como bioindicadoras da contaminação do meio ambiente por oocistos e em contraste com estudos realizados pelo LAERPH que detectaram alta prevalência em humanos. Como esta tese é a primeira a realizar a genotipagem de isolados em Goiás, ficou caracterizado um parasito com alta diversidade genética e variabilidade, com características fenotípicas virulentas. O que pode ser relacionado com a alta prevalência em humanos e com a gravidade da infecção em casos de toxoplasmose congênita.

8. CONCLUSÕES FINAIS

1. A prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos errantes e galinhas caipiras são elevadas, o que sugere elevada contaminação ambiental por oocistos, e que pode explicar a elevada soroprevalência em humanos na Região Metropolitana de Goiânia, Goiás.
2. As técnicas HAI e PCR não apresentaram concordância diagnóstica, mas é importante ressaltar que a detecção molecular de *T. gondii* em tecidos demonstra risco de contaminação para humanos.
3. Galinhas caipiras são importantes indicadores ambientais, e possibilitam a realização do isolamento do parasito para avaliação da viabilidade do *T. gondii* em seus tecidos, demonstrando risco para aquisição da toxoplasmose através da manipulação da carcaça e ingestão da carne malcozida.
4. Foram detectados dois genótipos ainda não descritos, demonstrando a importância da realização de estudos de epidemiologia molecular, e os isolados já caracterizados correspondem a um genótipo com variabilidade genética.
5. As análises de caracterização fenotípica demonstraram que isolados pertencentes ao mesmo genótipo diferem-se nos padrões de virulência e características morfométricas.
6. Com os resultados obtidos nesta tese, esperamos que futuros estudos sejam realizados na comparação dos genótipos obtidos em animais e humanos, para determinar as características genotípicas e fenotípicas de tais isolados para melhor compreensão da toxoplasmose na região.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABINPET. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**. Disponível em: <<http://www.abinpet.org.br/>>. Acesso em: 23 set. 2016.

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

AJIOKA, J. W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 2001, p. 1–19, 6 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987357>>.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, 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. 1185–96, set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380690>>.

AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 5, p. 684–689, set. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/342663>>.

AJZENBERG, D.; DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M.-L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1940–3, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15815026>>.

ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; JIMÉNEZ, N.; FONSECA, C.; DORTA-CONTRERAS, A. J.; COX, R.; CAPÓ, V.; BANDERA, F.; POMIER, O.; GINORIO, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. **Experimental parasitology**, v. 122, n. 3, p. 203–7, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318095>>.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; TORRES-CASTORENA, A.; LIESENFELD, O.; GARCÍA-LÓPEZ, C. R.; ESTRADA-MARTÍNEZ, S.; SIFUENTES-ÁLVAREZ, A.; MARSAL-HERNÁNDEZ, J. F.; ESQUIVEL-CRUZ, R.; SANDOVAL-HERRERA, F.; CASTAÑEDA, J. A.; DUBEY, J. P. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women in Rural Durango, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 271–274, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1829.1>>.

ALVES, E. da C. ***Toxoplasma gondii*: soroprevalência, isolamento e virulência de cepas obtidas de galinhas caipiras (Gallus gallus) comercializadas em feiras livres do município de Goiânia.** 2007. Universidade Federal de Goiás, 2007. Disponível em: <<https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/EduardoCostaII-2007.pdf>>.

ANDRADE, G. M. Q.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; CARELLOS, E. V. M.; ROMANELLI, R. M. C.; VITOR, R. W. A.; CARNEIRO, A. C. A. V.; JANUARIO, J. N. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy – an underestimated event? **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 1, p. 85–88, 2009. Disponível em: <http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=2034&cod=&idSecao=1>.

ARAÚJO, F. A. P.; SILVA, N. R. S.; OLIHESCKI, A. T.; BECK, C.; RODRIGUES, R. J. D.; FIALHO, C. G. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de gatos internados no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, detectados através da técnica de hemaglutinação indireta. **Acta Scientae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 89–92, 2003.

AVELAR, J. B. **Toxoplasmose crônica em gestantes. Avaliação da prevalência, fatores de risco e acompanhamento de um grupo de recém-nascidos em Goiânia – Goiás.** 2013. Universidade Federal de Goiás, 2013. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/3483/5/Tese_Juliana_Boaventura_Avelar_2013.pdf>.

AVELAR, J. B.; REZENDE, H. H. A.; STORCHILO, H. R.; CANDIDO, R. R. de L.; AMARAL, W. N. do; AVELINO, M. M.; CASTRO, A. M. de. Reativação da toxoplasmose durante o oitavo mês de gestação. **Revista Norte Mineira de Enfermagem**, v. 4, n. 1, p. 57–69, 2015.

AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N.; RODRIGUES, I. M. X.; RASSI, A. R.; GOMES, M. B. F.; COSTA, T. L.; CASTRO, A. M. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 33, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3918215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

AVELINO, M. M.; CAMPOS, D.; PARADA, J. C. B. de; CASTRO, A. M. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 108, n. 1, p. 19–24, 1 maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694964>>.

BARROS, L. D. de; TARODA, A.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L. da; SAMMI, A. S.; CARDIM, S. T.; MIURA, A. C.; SU, C.; MACHADO, R. Z.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaidura macroura*) in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**

= **Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 23, n. 4, p. 443–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517521>%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000400443&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

BECK, A. M.; MEYERS, N. M. Health enhancement and companion animal ownership. **Annual review of public health**, v. 17, p. 247–57, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8724226>>.

BELTRAME, M. A. V.; PENA, H. F. J.; TON, N. C.; LINO, A. J. B.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; PEREIRA, F. E. L. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 225–230, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.053>>.

BERTRANPETIT, E.; JOMBART, T.; PARADIS, E.; PENA, H.; DUBEY, J.; SU, C.; MERCIER, A.; DEVILLARD, S.; AJZENBERG, D. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 150–155, mar. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134816305494>>.

BLERGLER, R. **Man and dog: the psychology of a relationship**. [s.l.] Blackwell Scientific Publications, 1988.

BRACINI, G. L.; CHAPLIN, E. L.; STOBÉ, N. S.; ARAÚJO, F. A. P.; SANTOS, N. R. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, nos anos de 1986 a 1990. **Arquivos da Faculdade Veterinária da UFRGS**, v. 20, p. 134–149, 1992.

BRAGA, M. D. S. C. D. O.; ANDRÉ, M. R.; JUSI, M. M. G.; FRESCHI, C. R.; TEIXEIRA, M. C. A.; MACHADO, R. Z. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 21, n. 2, p. 107–11, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832749>>.

BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. A. CHARACTERIZATION of *Toxoplasma gondii* From Domestic Animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, p. 143–149, 2006.

BRESCIANI, K. D. S.; GENNARI, S. M.; SERRANO, A. C. M.; RODRIGUES, A. A. R.; UENO, T.; FRANCO, L. G.; PERRI, S. H. V.; AMARANTE, A. F. T. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 281–285, 29 jan. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-006-0262-4>>.

BROWN, R. R.; ELSTON, T. H.; EVANS, L.; GLASER, C.; GULLEDEG, M. L.; JARBOE, L.; LAPPIN, M. R.; MARCUS, L. C. American Association of Feline Practitioners 2003. **Compendium**, v. 25, n. 12, p. 948–96=50, 2003.

CÂMARA, J. T.; SILVA, M. G. da; CASTRO, A. M. de. Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do Nordeste, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 2, p. 64–70, fev. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032015000200064&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

CAMARGO, M. C. G. O.; MOURIZ, E. S. M.; D'AURIA, S. R. N. D.; FRAGA, G. M. D. **Toxoplasmose em felinos do município de São Paulo - Brasil, 1993-1995** Buenos Aires CONGRESSO ARGENTINO DE ZOONOSIS, , 1998. .

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 6, p. 117–8, 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14177810>>.

CAMILLO, G.; CADORE, G. C.; FERREIRA, M. S. T.; BRAUNIG, P.; MACIEL, J. F.; PIVOTO, F. L.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. *Toxoplasma gondii* and Neospora caninum antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 2, p. 263–265, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2015000200263&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

CANATTO, B. D.; SILVA, E. A.; BERNARDI, F.; MENDES, M. C. N. C.; PARANHOS, N. T.; DIAS, R. A. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1515–1523, 2012.

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

CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D.; DUBEY, J. P.; RUIZ, V. L. A.; DIAS, R. A.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Cats and Pigs From Rural Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 863–864, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-830R.1>>.

CHAPLIN, E.; SILVA, N. R. S.; SEBBEN, J. C.; ARAÚJO, F.; MENDES, L. Cadeia epidemiológica da toxoplasmose em Guaporé/RS, relacionando humanos e seus animais domésticos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v. 12, p. 25–34, 1984.

CHIKWETO, A.; SHARMA, R. N.; TIWARI, K. P.; VERMA, S. K.; CALERO-BERNAL, R.; JIANG, T.; SU, C.; KWOK, O. C.; DUBEY, J. P. Isolation and RFLP Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens (*Gallus domesticus*) in Grenada, West Indies, Revealed Widespread and Dominance of Clonal Type III Parasites. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 52–55, fev. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/15-945>>.

COELHO, W. M. D.; DO AMARANTE, A. F. T.; APOLINÁRIO, J. de C.; COELHO, N. M. D.; DE LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; BRESCIANI, K. D. S. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 4, p. 1009–1013, 31 out. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-011-2461-x>>.

CORNELISSEN, J. B. W. J.; VAN DER GIESSEN, J. W. B.; TAKUMI, K.; TEUNIS, P. F. M.; WISSELINK, H. J. An Experimental *Toxoplasma gondii* Dose Response Challenge Model to Study Therapeutic or Vaccine Efficacy in Cats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e104740, 3 set. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104740>>.

COSTA, D. G. C.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. S. A.; SANTANA, S. C.; MAGALHÃES, F. J. R.; FILHO, C. D. F. L.; RIBEIRO, V. O.; ALVES, L. C.; MOTA, R. a; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 98, n. 3, p. 679–80, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22150091>>.

COSTA, T. L. da. **Otimização e avaliação de métodos parasitológicos para diagnóstico da toxoplasmose em gestantes de risco e seus recém-nascidos após terapêutica específica**. 2007. Universidade Federal de Goiás, 2007.

CRISTINA, I.; BONNA, F.; FIGUEIREDO, F. B.; COSTA, T.; VICENTE, R. T.; SOBREIRO, L. G.; REGINA, M.; AMENDOEIRA, R. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos , para abate , em região rural do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 186–189, 2006.

CRUZ, M. de A.; ULLMANN, L. S.; MONTANO, P. Y.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats from Curitiba, Parana, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 20, n. 3, p. 256–258, 2011.

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

- DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 1, p. 34–52, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744306>>.
- DALLA ROSA, L.; MOURA, A. B. de; TREVISANI, N.; MEDEIROS, A. P.; SARTOR, A. A.; SOUZA, A. P. de; BELLATO, V. *Toxoplasma gondii* antibodies on domiciled cats from Lages municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 19, n. 4, p. 268–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21184709>>.
- DARDÉ, M. L.; AJZENBERG, D.; SMITH, J. Population structure and epidemiology of *Toxoplasma gondii*. In: WEISS, L. M.; KIM, K. (Ed.). ***Toxoplasma gondii* the model apicomplexan - perspectives and methods**. [s.l.: s.n.]p. 49–80.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **The Journal of parasitology**, v. 78, n. 5, p. 786–94, out. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1403418>>.
- DUBEY, J. .; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. CRC Press ed. [s.l.: s.n.]
- 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. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–75, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120791>>.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. 2. ed. ed. Maryland, USA: CRC Press, 2010a.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 1, p. 60–73, fev. 2010b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744305>>.
- DUBEY, J. P.; CHOUDHARY, S.; TILAHUN, G.; TIAO, N.; GEBREYES, W. A.; ZOU, X.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 1–2, p. 206–8, 1 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411374>>.
- DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; VIANNA, M. C. B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C. B. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Source Journal of Parasitology J. Parasitol**, v. 92, n. 1, p. 36–40, fev. 2006a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-655R.1>>.

DUBEY, J. P.; GOMEZ-MARIN, J. E.; BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M. C. B.; HILL, D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 67–72, 25 nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105721>>.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation 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.; SEIPEL, D.; SILVA, D.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondii* Isolates of Free-Ranging Chickens From Rio de Janeiro, Brazil: Mouse Mortality, Genotype, and Oocyst Shedding by Cats. **J. Parasitol**, v. 89, n. 4, p. 851–853, 2003a.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–78, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508057>>.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. Toxoplasmosis and neosporosis. In: **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3 edição ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 154–775.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **The Journal of parasitology**, v. 81, n. 6, p. 887–93, dez. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8544059>>.

DUBEY, J. P.; LEVY, M. Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DAHL, E.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. **The Journal of parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1015–8, out. 2004a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15562600>>.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–99, abr. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564564>>.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of experimental medicine**, v. 132, n. 4, p. 636–62, 1 out. 1970. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4927658>>.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná,

Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229–34, 14 nov. 2003b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630431>>.

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. **The Journal of parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721–6, ago. 2004b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15359466>>.

DUBEY, J. P.; PARNELL, P. G.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; DE YOUNG, R. W.; DAHL, E.; LEHMANN, T. Biologic and Molecular Characteristics of *Toxoplasma gondii* Isolates From Striped Skunk (*Mephitis mephitis*), Canada Goose (*Branta canadensis*), Black-Winged Lory (*Eos cyanogenia*), and Cats (*Felis catus*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1171–1174, out. 2004c. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-340R>>.

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, n. 1–2, p. 76–82, 31 ago. 2006b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672177>>.

DUBEY, J. P.; PROWELL, M. Ante-mortem diagnosis, diarrhea, oocyst shedding, treatment, isolation, and genetic typing of *Toxoplasma gondii* associated with clinical toxoplasmosis in a naturally infected cat. **The Journal of parasitology**, v. 99, n. 1, p. 158–60, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23966009>>.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M. F. V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **The Journal of parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709–12, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.jstor.org>>.

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 chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. **Veterinary parasitology**, v. 121, n. 3–4, p. 317–22, 26 maio 2004d. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135872>>.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: What's out and where did they come from. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190–195, 2009.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. da 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, 2007.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American journal of veterinary research**, v. 54, n. 2, p. 270–3, fev. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8430937>>.

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

DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1403–1410, dez. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457912002225>>.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–6, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202907>>.

FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; DE ALMEIDA-NETO, J. L.; DOS SANTOS, A.; DE MORAIS, D. F.; ATHAYDE, A. C. R.; DE AZEVEDO, S. S.; DE JESUS PENA, H. F. First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraíba state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 115, n. 10, p. 3983–3990, 9 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-016-5164-5>>.

FENG, Y.; LU, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; ZHANG, L.; YANG, Y. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Free-Range Chickens in Henan Province of China. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–5, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/8290536/>>.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in parasitology**, v. 18, n. 8, p. 355–9, ago. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12380023>>.

FERNANDES, M. F. T. S.; CAVALCANTI, E. F. T. S. F.; SILVA, J. G. da; MOTA, A. da R.; SOUZA NETO, O. L. de; SANTOS, A. de S.; ALBUQUERQUE, P. P. F. de; LIMA, D. C. V. de; MOTA, R. A. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in backyard chicken breeding in Northeast, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 105–108, mar. 2016. Disponível em: <www.cbpv.org.br/rbpv>.

FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; DE MATTOS, C. de C. B.; DE MATTOS, L. C.;

QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 190–195, out. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489411001767>>.

GALLI, S.; CÉSAR BELINATO, F.; MIZUKI LUCAS, T.; COSTA DA SILVA, R.; 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.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; MARANA, E. R. M. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 123–127, mar. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000100020&lng=pt&tlng=pt>.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. de. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91–97, mar. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781999000100017&lng=pt&tlng=pt>.

GOIÂNIA, P. de. **Região Metropolitana**. Disponível em: <<https://www.goiania.go.gov.br/html/principal/goiania/regiao metropolitana/regiao metropolitana.shtml>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

GONÇALVES, I. N.; UZÊDA, R. S.; LACERDA, G. A.; MOREIRA, R. R. N.; ARAÚJO, F. R.; OLIVEIRA, R. H. M.; CORBELLINI, L. G.; GONDIM, L. F. P. Molecular frequency and isolation of cyst-forming coccidia from free ranging chickens in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1–2, p. 74–79, 2012.

GONTIJO-SILVA, M.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0141700, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558622>>.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 5, p. 633–9, 1 set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11474426>>.

GUTIERREZ, J.; O'DONOVAN, J.; WILLIAMS, E.; PROCTOR, A.; BRADY, C.; MARQUES, P. X.; WORRALL, S.; NALLY, J. E.; MCELROY, M.; BASSETT, H.;

SAMMIN, D.; BUXTON, D.; MALEY, S.; MARKEY, B. K. Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR. **Veterinary parasitology**, v. 172, n. 1–2, p. 8–15, 27 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510517>>.

HAMILTON, C. M.; KELLY, P. J.; BOEY, K.; COREY, T. M.; HUYNH, H.; METZLER, D.; VILLENA, I.; SU, C.; INNES, E. A.; KATZER, F. Predominance of atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* in free-roaming chickens in St. Kitts, West Indies. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 104, 27 dez. 2017. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2019-6>>.

HENRIQUEZ, S. A.; BRETT, R.; ALEXANDER, J.; PRATT, J.; ROBERTS, C. W. Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 122–33, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19212132>>.

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

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 6, n. 1, p. 41–61, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16164008>>.

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, A. L. D. Determination of Genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 35, n. 6, p. 1411–1414, 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561–6, dez. 1995. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/30134669>>.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–67, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16221896>>.

HUSSIEN, M. O.; HASSAN ALFAKI, S.; MOHAMED EL HUSSEIN, A. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Chickens (*Gallus domesticus*) in Sudan. **International Journal of Infection**, v. In Press, n. In Press, 2 ago. 2016. Disponível em: <http://www.intjinfecion.com/?page=article&article_id=40312>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saúde - 2013 - Acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências - Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. [s.l.: s.n.]

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; RIVERA, H. N.; PRICE, C.; WILKINS, P. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the United States 2009-2010 and comparison with the past two decades. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 6, p. 1135–9, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710615>>.

KANETO, C. N.; COSTA, A. J.; PAULILLO, A. C.; MORAES, F. R.; MURAKAMI, T. O.; MEIRELES, M. V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. **Veterinary parasitology**, v. 69, n. 3–4, p. 203–10, maio 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9195730>>.

KHAN, A. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980–2992, 16 maio 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki604>>.

KLUN, I.; UZELAC, A.; VILLENA, I.; MERCIER, A.; BOBIĆ, B.; NIKOLIĆ, A.; RAJNPREHT, I.; OPSTEEGH, M.; AUBERT, D.; BLAGA, R.; VAN DER GIESSEN, J.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. The first isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from horses in Serbia. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 167, 4 dez. 2017. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2104-x>>.

KRAEMER, H. C.; BLOCH, D. A. Kappa coefficients in epidemiology: an appraisal of a reappraisal. **Journal of clinical epidemiology**, v. 41, n. 10, p. 959–68, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3193139>>.

LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G.; CUNHA, E. L. P.; CUTOLO, A. A. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 243–244, 2001.

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, n. 5, p. 960–71, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128519>>.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11423–11428, 25 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601438103>>.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **The Journal of protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37–58, fev. 1980. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6989987>>.

LIMA, J. A. S. **COMPARAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE PARASITOS ENTÉRICOS EM GATOS ERRANTES E DOMICILIADOS EM GOIÂNIA-GOÍÁS, ANÁLISE DA ACURÁCIA DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DA COPRO-PCR PARA O DIAGNÓSTICO DE *Toxoplasma gondii***. 2016. Universidade Federal de Goiás, 2016.

LOPES, C. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; SILVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865–1875, 8 jul. 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268815003295>.

LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; LOUREIRO, V. de S.; IKESAKI, J. Y. H.; BIRGEL, E. H. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 4, p. 221–224, jul. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651999000400003&lng=en&tlng=en>.

MACHADO, J. C.; PAIXÃO, R. L. A REPRESENTAÇÃO DO GATO DOMÉSTICO EM DIFERENTES CONTEXTOS SOCIOCULTURAIS E AS CONEXÕES COM A ÉTICA ANIMAL. **INTERthesis**, v. 11, n. 1, p. 231–253, 2014.

MAGALHÃES, F. J. R.; DA SILVA, J. G.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; PINHEIRO, J. W.; APARECIDO MOTA, R. High prevalence of toxoplasmosis in free-range chicken of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Acta Tropica**, v. 159, p. 58–61, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.034>>.

MATTOS, C. de C. B. de; SPEGIORIN, L. C. J. F.; MEIRA, C. da S.; SILVA, T. da C.; FERREIRA, A. I. da C.; NAKASHIMA, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MATTOS, L. C. de. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 129, n. 4, p. 261–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971902>>.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO, A. J.; POMPEU, E.; ANDRADE, H. F. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, n. 8, p. 876–881, ago. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2004.01280.x>>.

MELO, R. P. B.; ALMEIDA, J. C.; LIMA, D. C. V.; PEDROSA, C. M.; MAGALHÃES, F. J. R.; ALCÂNTARA, A. M.; BARROS, L. D.; VIEIRA, R. F. C.; GARCIA, J. L.; MOTA, R. A. Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.

224, p. 92–95, jul. 2016. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401716301881>>.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; MATTOS, M. M. O.; LABARTHE, N. *Giardia* spp . em amostras fecais de gatos domésticos do Rio de Janeiro , RJ *Giardia* spp . in fecal samples of domestic cats from Rio de Janeiro , RJ. **Acta Scientae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 469–480, 2007.

MENDEZ, L. D. **Prevalência de coccídios e anticorpos anti-toxoplásmicos em gatos domésticos de Porto Alegre, RS - Brasil**. 1983. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1983.

MILLAR, P. R.; ALVES, F. M. X.; TEIXEIRA, V. Q.; VICENTE, R. T.; MENEZES, E. M.; SOBREIRO, L. G.; DE ALMEIDA PEREIRA, V. L.; AMENDOEIRA, M. R. R. Occurrence of infection with *Toxoplasma gondii* and factors associated with transmission in broiler chickens and laying hens in different raising systems. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 231–236, 2012.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Normativas do Concea para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Disponível em:
<http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2016.

MONCADA, P. a; MONTOYA, J. G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 7, p. 815–828, 2012.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet (London, England)**, v. 363, n. 9425, p. 1965–76, 12 jun. 2004. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194258>>.

MOREIRA MARQUES, J.; BEATRIZ ISBRECHT, F.; MIZUKI LUCAS, T.; MARIA POLIDO GUERRA, I.; DALMOLIN, A.; COSTA DA SILVA, R.; LANGONI, H.; VIEIRA DA SILVA, A. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de uma comunidade rural do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 889–898, 2009.

MORON, A. F.; CARVALHO, F. H. C.; SANTANA, R. M. Toxoplasmose. In: **Schor N. Guia de obstetrícia**. SÃO PAULO: MANOELE, 2003.

MOSE, J. M.; KAGIRA, J. M.; KARANJA, S. M.; NGOTHU, M.; KAMAU, D. M.; NJUGUNA, A. N.; MAINA, N. W. Detection of Natural *Toxoplasma gondii* Infection in Chicken in Thika Region of Kenya Using Nested Polymerase Chain Reaction. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–5, 2016. Disponível em:
<<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/7589278/>>.

MOURA, F. L. De; AMENDOEIRA, M. R. R.; BASTOS, O. M. P.; MATTOS, D. P. B. G. de; FONSECA, A. B. M.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B. das; MILLAR, P. R.

Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant and postpartum women attended at public healthcare facilities in the City of Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 200–7, 2013.

MUHAMMAD, F. Z.; GAREDAGHI, Y. Seroprevalence of Toxoplasmosis in Free Range chickens in Tabriz area of Iran by using ELISA test. **Natural Science and Discovery**, v. 2, n. 1, p. 18, 1 abr. 2016. Disponível em: <<http://dergipark.gov.tr/doi/10.20863/nsd.11240>>.

MURAT, J.-B.; HIDALGO, H. F.; BRENIER-PINCHART, M.-P.; PELLOUX, H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 9, p. 943–56, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053275>>.

NETO, O. J. S. **PERFIL SOROEPIDEMIOLÓGICO E DETECÇÃO MOLECULAR DE**. 2013. Universidade Federal de Goiás, 2013.

NETO, O. J. S.; TAVEIRA, R. Z.; AMARAL, A. das G.; OLIVEIRA, B. C. de; NASCIMENTO, E. de P. B. AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM GALINHAS DE POSTURA CAIPIRAS CRIADAS NA REGIÃO DO OESTE GOIANO. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 10, n. 18, p. 510–516, 2014.

NETTO, E. G.; MUNHOZ, A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. OCORRÊNCIA DE GATOS SOROPOSITIVOS PARA *Toxoplasma gondii* NICOLLE E MANCEAUX, 1909 (APICOMPLEXA : TOXOPLASMATINAE) NA CIDADE DE NITERÓI, RIO DE JANEIRO. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1909, p. 145–149, 2003.

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

OLIVEIRA, L. N.; COSTA JUNIOR, L. M.; DE MELO, C. F.; RAMOS SILVA, J. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; AZEVEDO, S. S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO, D. a F. V; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 95, n. 1, p. 235–7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18578589>>.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385–1394, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>>.

PASCHALE, M. De; AGRAPPI, C.; MANCO, M. T.; CERULLI, T.; CLERICI, P. Implementation of Screening for *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnancy. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 2, n. 3, p. 112–116, 2010. Disponível em:

<<http://www.jocmr.org/index.php/JOCMR/article/view/321>>.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–569, abr. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751907003359>>.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. 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, ago. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528805001694>>.

PERDONCINI, G.; PASQUALI, A.; MARIANI, F.; CEMBRANEL, D. J.; ESCOPELI, K. S. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em aves e suínos: um problema para a saúde pública. **Unoesc & Ciência**, v. 1, n. 1, p. 57–64, 2010. Disponível em: <<http://editora.unoesc.edu.br/index.php/acbs/article/view/175>>.

PINTO, L. D.; ARAUJO, F. A. P.; STOBBS, N. S.; MARQUES, S. M. T. Seroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil Seroepidemiology. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2464–2469, 2009.

REZENDE, H. H. A. **Prevalência de parasitos intestinais em gatos errantes em Goiânia – Goiás: ênfase no diagnóstico de *Toxoplasma gondii* e avaliação da acurácia de técnicas parasitológicas**. 2015. Universidade Federal de Goiás, 2015.

REZENDE, H. H. A.; AVELAR, J. B.; STORCHILO, H. R.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. De. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 471–474, dez. 2015a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612015000400471&lng=en&tlng=en>.

REZENDE, H. H. A.; AVELAR, J. B.; STORCHILO, H. R.; VINAUD, M. C.; DE CASTRO, A. M. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, 2015b.

REZENDE, H. H. A.; STORCHILO, H. R.; LIMA, J. A. S.; GOMES JÚNIOR, A. R.; GOMES, T. C.; SOUZA, J. Y. de; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N. do; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. de. Nursing infant with acquired toxoplasmosis in the first months of life – a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 2, p. 265–74, 24 ago. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000410&lng=en&tlng=en>.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.05013-11>>.

ROSA, J. A. et al. *Toxoplasma gondii* em gatos da cidade de Araraquara-SP - Estudo sorológico e coproparasitológico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 8, p. 105–111, 1987.

ROSSO, F.; LES, J. T.; AGUDELO, A.; VILLALOBOS, C.; CHAVES, J. A.; TUNUBALA, G. A.; MESSA, A.; REMINGTON, J. S.; MONTOYA, J. G. Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 3, p. 504–8, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337350>>.

RUDZINSKI, M.; KHOURY, M.; COUTO, C.; AJZENBERG, D. Reactivation of Ocular Toxoplasmosis in Non-Hispanic Persons, Misiones Province, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 912–913, maio 2016. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/5/15-0025_article.htm>.

SÁ, S. G. de. **Transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* em camundongos experimentalmente infectados com oocistos da cepa ME49**. 2011. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011.

SÁ, S. G. de; RIBEIRO-ANDRADE, M.; SILVA, L. T. R.; SOUZA NETO, O. L. de; LIMA, D. C. V.; PEDROSA, C. de M.; BEZERRA, M. J. G.; MOTA, R. A. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in free-range chickens in the semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 2, p. 221–225, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612017000200221&lng=en&tlng=en>.

SABIN. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, p. 801–807, 1939.

SAMICO-FERNANDES, E. F. T.; DE MELO, R. P. B.; DE CÁSSIA PEIXOTO KIM, P.; DE ALMEIDA, J. C.; DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; DA SILVA, J. C. R.; MOTA, R. A. First report of genotype #65 of *Toxoplasma gondii* in pigs. **Parasitology research**, v. 114, n. 10, p. 3927–30, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26268568>>.

SAMPAIO, A. B. Percepção da população do município de Cruz Alta (RS) sobre zoonoses transmitidas por cães e gatos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 3, p. 179–185, 2014.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-

linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetics**, v. 90, n. 6, fev. 1993. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00202486>>.

SANTOS, M. C. F. **Frequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas caipira e frangos de corte em regiões dos Estados do Rio Grande do Norte e Paraíba**. 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

SANTOS, S. M.; AMARAL, V.; REBOUÇAS, M.M. DRUMOND, L. S. Anticorpos antitoxoplasma detectados por hemaglutinação indireta em soros de gatos domésticos provenientes da capital do estado de São Paulo, Brasil. **Biológico**, v. 49, p. 163–165, 1983.

SARAF, P.; SHWAB, E. K.; DUBEY, J. P.; SU, C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental parasitology**, v. 174, n. 3, p. 25–30, mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350221>>.

SARTORI, A. L.; MINAMISAVA, R.; AVELINO, M. M.; MARTINS, C. A. Triagem pré-natal para toxoplasmose e fatores associados à soropositividade de gestantes em Goiânia, Goiás. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 2, p. 93–98, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v33n2/v33n2a07>>.

SAYARI, M.; NAMAVARI, M.; MOJAVER, S. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in free ranging chickens (*Gallus domesticus*). **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 3, p. 845–847, 30 set. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12639-014-0590-8>>.

SCHARES, G.; BANGOURA, B.; RANDAU, F.; GOROLL, T.; LUDEWIG, M.; MAKSIMOV, P.; MATZKEIT, B.; SENS, M.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J.; OPSTEEGH, M.; VAN DER GIESSEN, J. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and probability of detecting tissue cysts in backyard laying hens compared with hens from large free-range farms. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 12, p. 765–777, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.003>>.

SHWAB, E. K.; JIANG, T.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 46, n. 2, p. 141–6, fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.10.005>>.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82–5, 3 set. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1355855>>.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749–2761, 27 set. 2009.

Disponível em: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2009.0087>>.

SILVA, J. C. R.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; AMAJONES, V. R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L. E. O.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Sera of Domestic Cats From Guarulhos and São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 419–420, abr. 2002. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/0022-3395%282002%29088%5B0419%3APOTGAI%5D2.0.CO%3B2>>.

SILVA, M. G.; AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N.; CASTRO, A. M. Optimizing the parasitological diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 11, p. 1–8, 2013. Disponível em: <http://www.publicacoes.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/view/2564>>.

SILVEIRA, L. H. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul**. 2009. Universidade de São Paulo, 2009.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International journal for parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135–45, out. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394184>>.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology research**, v. 107, n. 2, p. 253–60, jul. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20514494>>.

SOBRINHO, L. S. V.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A. D.; DE LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.; LEUTENEGGER, C.; BIONDO, A. W.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 187, n. 1–2, p. 302–6, 8 jun. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285010>>.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesion anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kalazar Dell'uomo: notapreliminare. **Ver. Soc Sci**, v. 3, p. 109–112, 1908.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19765337>>.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of

parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841–848, jun. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751906001056>>.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137–42, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446116>>.

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S. J.; TANG, K.; BEATTY, W. L.; HAJJ, H. El; JEROME, M.; BEHNKE, M. S.; WHITE, M.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 314, n. 5806, p. 1776–80, 15 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170305>>.

TEIXEIRA, W. F. P.; TOZATO, M. E. G.; PIERUCCI, J. C.; VITAL, G. P.; CRUZ, A. C.; LOPES, W. D. Z.; CURSINO, M. S.; JOAQUIM, S. F.; SOARES, V. E.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J. da. Investigation of *Toxoplasma gondii* in semen, testicle and epididymis tissues of primo-infected cats (*Felis catus*). **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 90–93, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.003>>.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 364–9, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430665>>.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–58, nov. 2000a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751900001247>>.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–58, nov. 2000b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113252>>.

THIÉBAUT, R.; LEPROUST, S.; CHÊNE, G.; GILBERT, R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. **Lancet (London, England)**, v. 369, n. 9556, p. 115–22, 13 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223474>>.

TREVISANI, N.; BARROS, L. D.; VIEIRA-NETO, A.; SARTOR, A. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, J. L.; MOURA, A. B. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from naturally infected *Gallus domesticus* in Santa Catarina state, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 69, n. 1, p. 139–145, 2017.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina**, v. 13, p. 69–75, 1992.

WANG, L.; CHEN, H.; LIU, D.; HUO, X.; GAO, J.; SONG, X.; XU, X.; HUANG,

K.; LIU, W.; WANG, Y.; LU, F.; LUN, Z.-R.; LUO, Q.; WANG, X.; SHEN, J. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53483, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308233>>.

WEBSTER, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 112, 2010. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-112>>.

YADAV, R. K.; MAITY, S.; SAHA, S. A review on TORCH: groups of congenital infection during pregnancy. **Journal of Scientific and Innovative Research JSIR**, v. 3, n. 32, p. 258–264, 2014. Disponível em: <http://www.jsirjournal.com/Vol3_Issue2_23.pdf>.

YING, Y.; VERMA, S. K.; KWOK, O. C. H.; ALIBANA, F.; MCLEOD, R.; SU, C.; DUBEY, J. P.; PRADHAN, A. K. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens from grocery stores and farms in Maryland, Ohio and Massachusetts, USA. **Parasitology Research**, v. 116, n. 5, p. 1591–1595, 24 maio 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-017-5420-3>>.

ZHU, J.; YIN, J.; XIAO, Y.; JIANG, N.; ANKARLEV, J.; LINDH, J.; CHEN, Q. A sero-epidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 360–363, dez. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708004809>>.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Uso de animais (CEUA-UFG) 024/2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 06 de fevereiro de 2016.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 024/16

I - Finalidade do projeto de pesquisa (pesquisa/aula prática): Doutorado

II - Identificação:

- ☐ Data de apresentação a CEUA: 20 de outubro de 2016
- ☐ Título do projeto: Epidemiologia molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* em gatos errantes (*Felis catus domesticus*) em Goiânia, Goiás, Brasil.
- ☐ Pesquisador Responsável/ Unidade: Hanster Hallison Alves Rezende.
- ☐ Pesquisadores Participantes: Ana Maria de Castro, Jaqueline Ataíde Silva Lima, Juliana Boaventura Avelar, Marina Clare Vinaud
- ☐ Médico Veterinário/CRMV: Everton Kort Kamp Fernandes CRMV-GO 5137
- ☐ Unidade onde será realizado: Depto de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia /IPTSP/UFG.

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Justificativa

T. gondii é um protozoário de prevalência mundial. Com registros em todos os continentes e em todos os climas, devido a transmissão por oocistos liberados nas fezes dos gatos jovens não imunes. Os gatos e felídeos selvagens são os únicos animais que podem realizar o ciclo sexuado, eliminando após a primo infecção milhões de oocistos imaturos nas fezes (Kawazoe 2003).

Uma das principais preocupações da infecção pelo *T. gondii* é a transmissão congênita. Estudos em Goiânia-GO demonstraram que 34,2% das gestantes estão sob risco de adquirirem a doença com uma taxa de soroconversão de 8,6% (Avelino e cols. 2003). Gontijo-Silva (2006), estudando mulheres com gravidez de risco para Toxoplasmose, conseguiu detectar o parasito em 33% de suas amostras, dando continuidade aos estudos Costa (2007), demonstrou a eficácia do tratamento sobre o parasitismo do *T. gondii*, pois de 32 amostras de recém-nascidos de mulheres que receberam o tratamento profilático, durante a gestação, em nenhum foi possível detectar o parasito. Avelar 2013 demonstrou uma prevalência de 51,85% de mães cronicamente infectadas para toxoplasmose em uma maternidade de referência em Goiânia-GO. Estudos ainda não publicados por Rezende e cols., (2014), demonstraram que 18% dos gatos errantes capturados pelo Centro de Zoonose de Goiânia, no período de 2012 a 2013, estavam liberando oocistos em suas fezes, e que 64% dos soros analisados dos gatos eram soropositivos para *T. gondii*. Demonstrando assim a importância da continuidade de estudos com o *T. gondii* em Goiânia, Goiás.

Isolar e realizar a caracterização molecular de diferentes cepas de *T. gondii* é de suma importância para estudos epidemiológicos, permitindo a investigação da distribuição e da virulência das cepas que circulam numa determinada região (Silva 2001).

Os trabalhos acima citados, com ênfase no *T. gondii*, demonstraram claramente alta prevalência do parasito nos materiais biológicos estudados, e todas estas amostras analisadas eram do Estado de Goiás. O

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



isolamento e a caracterização molecular dos isolados nas amostras de fezes e tecidos de gatos errantes demonstrará quais as linhagens de cepas que circulam naturalmente em Goiás. Devido à alta prevalência de parasitos intestinais em gatos errantes em Goiânia, Goiás, e o seu papel na contaminação do ambiente, é de suma importância a utilização de técnicas laboratoriais que apresentem boa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Assim, a avaliação da acurácia de diferentes técnicas imunológicas é de extrema importância para a aplicação destas técnicas no laboratório veterinário, permitindo medir a qualidade e acurácia da metodologia, para sua aplicação na rotina laboratorial.

OBJETIVO GERAL:

Estudar a epidemiologia molecular da toxoplasmose em gatos errantes no estado de Goiás. Realizar a caracterização molecular de isolados de *T. gondii* em isolados de gatos errantes em Goiânia

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar o *T. gondii* em tecidos de gatos errantes através da reação de PCR.
2. Isolar em camundongos cepas de *T. gondii* oriundas de tecidos dos gatos.
3. Realizar esporulação artificial dos oocistos das amostras fecais analisadas.
4. Realizar a infecção experimental de camundongos de oocistos esporulados artificialmente.
5. Caracterizar molecularmente os isolados obtidos dos gatos errantes em linhagens do tipo I, tipo II e tipo III utilizando a técnica de PCR-RFLP (polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição) por multilocus pelos loci DNA: SAG1, SAG2 (3'SAG2 e 5'SAG2), SAG2-alt SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e APICO.
6. Comparar o perfil genotípico dos isolados obtidos com os genótipos já isolados em outras regiões no Brasil buscando em artigos de outros grupos de pesquisa já publicados.
7. Realizar sorologia IgG e IgM de amostras de soros dos animais pelas técnicas de ELISA (Enzima-imunoensaio), Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e Teste de Aglutinação Modificado.

IV - Sumário do projeto:

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Não há possibilidade de métodos alternativos que dispensem o uso de animais, haja visto que o isolamento do parasito *Toxoplasma gondii* é realizado a partir de amostras biológicas de gatos, seu hospedeiro definitivo. Para a realização da caracterização molecular é necessário que haja a inoculação e o isolamento em camundongos para aquisição das formas taquizoítas do parasito, que permitem os estudos moleculares.
- ☐ **Prevê Projeto Piloto:** Não
- ☐ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc): 450 Camundongos Balb/c e/ou Swiss, sendo 225 machos e 225 fêmeas; 50 gatos, sendo 25 machos e 25 fêmeas; 100 galinhas caipira
- ☐ **Fonte de obtenção do animal:** Biotério Central da UFG- camundongos; Fazendas de pequenos produtores- galinhas; Centro de Controle de Zoonoses- gatos
- ☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Serão alojados no biotério do IPTSP, com ambiente regulado, gaiolas para camundongos com cama de maravalha, enriquecidos com papel picado.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pro-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso I, Campus Samambaia (Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



- ☐ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Sim, será inoculado agente infeccioso. Os riscos aos pesquisadores podem ocorrer pela má utilização de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras, jalecos e óculos de proteção. Podem ser observados riscos psicológicos, pelos procedimentos de eutanásia que os animais são submetidos, mas os alunos serão acompanhados pela orientadora e só irão realizar os procedimentos após realizar observação de alunos que tenham experiência, e apenas quando se sentirem seguros para realizá-los, sempre sob supervisão de alunos treinados e pela orientadora.
- ☐ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:**
- ☐ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** A pesquisa pretende evitar sofrimento e dor aos animais, camundongos infectados pelo *T. gondii*, serão eutanasiados assim que apresentarem sintomatologia específica da doença, como o desfecho da infecção é a morte do animal, essa morte será antecipada para evitar dor e sofrimento. Outro ponto é o monitoramento diário que os animais são submetidos, por pesquisadores experientes e também a pesquisa conta com um médico veterinário para consultas em casos especiais. Os camundongos também serão observados quanto a temperatura, umidade, alimentação e necessidades sociais como viver em grupo. Caso os animais do grupo de experimento morram restando apenas um camundongo na gaiola, o animal será colocado em gaiola transparente para que ele possa observar outros animais da mesma espécie.
- ☐ **Grau de invasividade:** GI 1
- ☐ **Material utilizado em outros projetos:** Não será utilizado
- ☐ **Método de eutanásia:** Camundongos- deslocamento cervical; Gatos- anestesia e cloreto de potássio; Galinhas-deslocamento cervical
- ☐ **Destino do animal:** Camundongos e galinhas serão incinerados na EAV-UFV; Gatos- o Centro de Zoonoses encaminhará para o aterro sanitário

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ☐ Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFV: Completos
- ☐ Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: Já citados

Foram verificadas 04 pendências que listamos a seguir com as respectivas respostas:

1. Como serão realizadas as coletas de sangue das galinhas caipira? A coleta de sangue será realizada no momento da eutanásia, após o deslocamento cervical com exsanguinação (alterado na folha de número 10);
2. Como será realizada a eutanásia das galinhas caipiras? Por deslocamento cervical seguida de exsanguinação (alterado na folha de número 11);
3. Qual será o destino das carcaças? Galinhas caipiras serão incineradas na EAV/UFV (alterado na página 11);
4. Como será garantida a ética e bem-estar referente às galinhas mediante a alteração da emenda

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pro-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



proposta? O bem-estar das galinhas está relacionado com a eutanásia bem feita por profissional experimentado para evitar a dor e o sofrimento.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até agosto de 2018.

VII - Data da reunião: 06/02/2017.


Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética Humano

UFG - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Triagem sorológica em recém-nascidos para Toxoplasmose e Tripanossomíase Americana (Doença de Chagas) através da inclusão destes testes a ser implantada pelo SUS no teste do pezinho visando o diagnóstico precoce da infecção congênita

Pesquisador: Ana Maria de Castro

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 37353714.0.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIÁS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.125.738

Apresentação do Projeto:

Conforme declara a pesquisadora Vários trabalhos na literatura demonstraram a necessidade de estudos mais aprofundados fazendo o seguimento das mães com diagnóstico positivo para Toxoplasmose e doença de Chagas, e principalmente de seus recém-nascidos, como se avaliar a eficácia terapêutica como medida profilática para evitar a transmissão congênita da infecção grave. Mas mais importante ainda, é a detecção precoce de crianças congenitamente infectadas, que não foram identificadas durante a gravidez e por isso a inclusão da análise dos anticorpos específicos de imunoglobulinas das classes - IgG e IgM no teste do pezinho poderia auxiliar a minimizar a falha observada com o Programa de Controle da Toxoplasmose vigente, no qual não se faz a vigilância da soroconversão. Como ainda não há uma forma de prevenir a transmissão vertical da doença de Chagas, faz-se necessário o diagnóstico precoce nos nascidos de mães sabidamente infectadas pelo T. cruzi o que inclui o seu tratamento o quanto mais cedo possível. Tal diagnóstico influenciaria na eficácia da terapia, a qual está diretamente relacionada ao tempo da infecção, sendo efetivo nas fases iniciais e muito pouco benéfico nas formas crônicas avançadas.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica		
Bairro: St. Leste Universitário	CEP: 74.605-020	
UF: GO	Município: GOIÂNIA	
Telefone: (62)3269-8338	Fax: (62)3269-8426	E-mail: cephcu@ig.com.br

Continuação do Parecer: 2.125.798

Metodologia Proposta:

Seleção dos pacientes: A população estudada será constituída por todos os recém-nascidos (RN), que forem realizar o Teste do Pezinho, para triagem neonatal, na Maternidade Dona Iris e no Hospital das Clínicas (HC) da UFG, estima-se 2.000 coletas no período proposto, este número é baseado nos dados de atendimento das duas maternidades nos últimos dois anos. As mães serão informadas da importância da pesquisa para a saúde de seus filhos e o material biológico somente será coletado após aprovação de suas mães com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

A inclusão da sorologia para toxoplasmose será feita em todos os RN da Maternidade Dona Iris, e para a doença de Chagas, nos RN de mulheres soropositivas (identificadas na triagem pré-natal), que forem realizar o Teste do Pezinho na maternidade do HC e/ou Maternidade Dona Iris. O estudo será realizado durante o período de 24 meses nas duas maternidades públicas, Dona Iris (para partos de baixo risco) e no HC (para partos de alto risco). Os RN terão o acréscimo de um segundo papel filtro em sua coleta sanguínea do teste do Pezinho, para ampliar a pesquisa da triagem neonatal, para doença de Chagas e toxoplasmose, seguindo a identificação e a especificações padronizadas pelo

Ministério da Saúde. Para toxoplasmose, os casos que se mostrarem suspeitos (altos títulos de IgG e/ou da IgM positivo), serão chamados e terão o sangue periférico coletado, e sendo este avaliado por vários métodos diagnósticos sorológico e moleculares.

Critério de Inclusão:

Colher amostras de todos os Recém-nascidos que as mães concordarem na participação do projeto, assinando o termo de livre esclarecido. O material biológico será coletado em duas maternidades públicas de referência (Maternidade do Hospital das Clínicas e Maternidade Dona Iris), em Goiânia, Goiás.

Critério de Exclusão:

A não permissão da mãe para participação no projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Implementar a triagem sorológica para Toxoplasmose e Tripanossomíase americana (Doença de Chagas) ao teste do pezinho, visando a identificação através do diagnóstico precoce das duas infecções congênitas nos recém nascidos (na primeira semana de vida) e aos seis meses, o

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.125.738

material biológico será coletado em duas maternidades públicas de referência (Maternidade do Hospital das Clínicas e Maternidade Dona Iris), em Goiânia, Goiás.

Objetivo Secundário:

- Realizar triagem sorológica para toxoplasmose e doença de Chagas (IgG e IgM) em sangue coletado em polpa digital dos recém-nascidos que forem realizar o Teste do Pezinho, utilizando papel de filtro.
- Realizar testes sorológicos confirmatórios e complementares: avidéz da IgG, IgA, e PCR na confirmação dos recém nascidos (RN) com indicação de infecção congênita, utilizando sangue periférico dos RN.
- Analisar a sensibilidade do Western Blot para identificar diferentes padrões de reconhecimento das proteínas do *T. gondii* por anticorpos IgG e IgM de recém-nascidos e suas respectivas mães.
- Avaliar e comparar a sensibilidade da sorologia em papel de filtro com a sorologia realizada com sangue periférico, na detecção dos recém-nascidos com infecção congênita.
- Avaliar os níveis de anticorpos nos recém-nascidos, após seis (6) e nove (9) meses, comparando aos resultados obtidos na primeira semana de vida.
- Quantificar os anticorpos específicos das classes IgG e IgM contra o *T. cruzi* na mãe e no filho e compará-los, avaliando este procedimento na indicação da infecção ativa.
- Determinar o ponto de corte acima do qual a sorologia no RN maior do que a materna seria indicativo de infecção congênita (IgG específica) na doença de Chagas e na toxoplasmose.- Dinamizar o diagnóstico precoce da toxoplasmose e doença de Chagas congênita no sangue de recém nascidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos, pois a coleta do papel filtro já está padronizada pelo Ministério de Saúde, somente será acrescentado mais um segundo papel de filtro, direcionado para pesquisa proposta, sendo realizada durante o procedimento normal do teste do pezinho.

Benefícios:

A implementação da triagem sorologica para estes parasitos, poderia melhorar muito o prognóstico dos nascidos infectados que por falta de um diagnóstico precoce, evoluem para forma grave da doença.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cepcufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.125.738

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Estima-se que este estudo contribuirá para a implementação da triagem sorológica para estes parasitos, poderia melhorar muito o prognóstico dos nascidos infectados que por falta de um diagnóstico precoce, evoluem para forma grave da doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios necessários foram apresentados adequadamente conforme a RESOLUÇÃO 466/12. Bem como as autorizações para o desenvolvimento do projeto.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclui-se que a Emenda apresentada esta de acordo com as necessidades para o bom desenvolvimento do projeto, tendo possíveis benefícios para a população estudada. Para tanto, recomendo a aprovação do mesmo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional CNS 001/13, manifesta-se pela aprovação desta Emenda.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_624144_E1.pdf	25/04/2017 10:28:11		Aceito
Outros	ementa_ppsus.pdf	25/04/2017 10:27:18	HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE	Aceito
Outros	curriculo_taynara_cristina.pdf	22/04/2017 19:27:54	HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE	Aceito
Outros	curriculo_jessica_yonara.pdf	22/04/2017 19:27:34	HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE	Aceito
Outros	curriculo_Ana_flavia_eugenio.pdf	22/04/2017 19:26:50	HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto.docx	22/04/2017 19:07:37	HANSTTER HALLISON ALVES	Aceito

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.505-020
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cepcufg@yahoo.com.br

Anexo 3 - Artigo produto do doutorado

Nursing infant with acquired toxoplasmosis in the first months of life – a case report

Publicado na Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v.59, e63, 2017. DOI: [10.1590/S1678-9946201759063](https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759063). ISSN: 1678-9946. Fator de impacto: 1.052 (Publicado).

Hanstter Hallison Alves Rezende¹; Heloísa Ribeiro Storchilo¹; Jaqueline Ataíde Silva Lima¹; Antônio Roberto Gomes Júnior¹; Taynara Cristina Gomes¹; Jéssica Yonara de Souza¹; Mariza Martins Avelino², Waldemar Naves do Amaral², Marina Clare Vinaud¹; Ana Maria de Castro^{1*}.

¹ Laboratory for Host-Parasite Relationship Studies, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás – UFG

² Clinical Hospital, Faculty of Medicine, Federal University of Goiás – UFG

* Corresponding author: Ana Maria de Castro. Laboratory of studies of the host-parasite relationship, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás – UFG. Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiania 74605-050, GO, Brazil. Phone: +55 62 3209 6113; Fax: +55 52 3209-6363. Email address: amaria.ana@gmail.com

ABSTRACT

Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii*, and the probability of this infection occurring in the first months of life is usually low because its transmission is related to eating habits. A 6-month-old nursing infant was diagnosed with acute toxoplasmosis, which was identified through anti-*T. gondii* IgA, IgM and low avidity IgG serologic assays and polymerase chain reaction (PCR) and mice bioassay parasitology tests, although its mother tested seronegative. This serological divergence between mother and child led us to interview the mother regarding epidemiological factors. During this interview, she reported that she had given her 2-month-old baby a piece of undercooked beef to suck on. After some time, the baby presented fever and cervical lymphadenitis. This report emphasizes the importance of serological surveys

of toxoplasmosis in nursing infants presenting with fever and lymphadenitis, in view of the possible transmission of toxoplasmosis in the first months of life.

INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. The infection is usually acquired through the ingestion of food and/or water contaminated with cysts and oocysts of the parasite, transmitted through a blood transfusion and/or by vertical transmission¹.

In most cases, toxoplasmosis acquired by immunocompetent individuals is characterized by lymphadenitis of the cervical lymph nodes without other complaints of pain². Acquired toxoplasmosis is commonly related to eating habits, especially the ingestion of raw or undercooked meat containing cysts and bradyzoites, or the ingestion of raw vegetables contaminated with oocysts. Toxoplasmosis is rarely acquired in the first months of life because nursing infants feed exclusively on breast milk^{3,4}.

The diagnosis of toxoplasmosis is based on immunological assays for the detection of IgA, IgE, IgM, IgG and IgG avidity. Parasitological assays such as the polymerase chain reaction (PCR) and mice bioassay are also used to detect the presence of the parasite^{2,5,6}. IgG antibodies are markers of chronic or late infection, while other antibodies such as IgA, IgE and IgM are markers of a recent or acute infection. However, the diagnostic confirmation of active infection is complex because IgM levels may remain significantly high for a period of more than 12 months, thus requiring the association with levels of other antibodies such as IgA, IgE and IgG avidity^{6,7,8}. This study is a case report of acquired toxoplasmosis detected in a nursing infant in the first months of life.

CASE DESCRIPTION

Nursing infant MSS, male, born on 14 Apr 2016, underwent a newborn screening test at 7 days of age at the Nova Era Comprehensive Health Care Center (CAIS) in Aparecida de Goiania, GO, Brazil. At that time, the newborn was asymptomatic and presented a good general condition. Before the newborn screening collection procedure, the mother was invited to participate in a newborn toxoplasmosis

survey conducted at the Federal University of Goiás (UFG), which involved the detection of toxoplasmosis through filter paper screening. The mother signed the consent form and was informed about the survey, as well as the need for a new blood collection within a period of a few months.

The newborn screening using filter paper tested negative for toxoplasmosis. Therefore, this newborn was selected for the negative control group. Six months after the first blood sample was collected, this mother and baby were invited for the second blood collection on 19 Oct 2016. The mother presented negative anti-*T. gondii* IgM and IgG results, while the 6-month-old nursing infant tested positive in the anti-*T. gondii* IgA, IgM, low avidity IgG and PCR assays.

The divergent results of mother and child led us to collect additional blood samples on 18 Nov 2016, which confirmed the previous results. The mice bioassay was performed on the leukocyte cream of the child's peripheral blood. A week after the inoculation of BALB/c mice, the animals presented clinical signs of infection such as lethargy and ruffled fur. The animals were euthanized and subjected to peritoneal lavage. An optical microscopy analysis of this material revealed the presence of *T. gondii* tachyzoites. A PCR was performed of the samples collected via peritoneal lavage, which confirmed *T. gondii* infection.

To determine how such a young nursing infant became infected, his mother was interviewed regarding epidemiological aspects. She stated that they did not have house pets such as dogs or cats, but that such animals frequented the yard because their house was not enclosed by outer walls or fences. As for the child's feeding habits, his mother reported that he consumed only filtered water and breast milk. The mother then suddenly remembered attending a barbecue when her baby was 2 months old and that she had given him a piece of undercooked beef to suck on. After a certain interval of time, the child presented swollen lymph nodes and fever. The child's pediatrician attributed these signs to a viral infection, which progressed benignly.

After confirmation of the acquired toxoplasmosis, the nursing infant was sent to the Department of Pediatric Infectology at the Clinical Hospital of UFG, where he was prescribed sulfadiazine (100 mg/kg/day, every 12 hours), pyrimethamine (1 mg/kg/day, once daily) and folinic acid (10 mg/day, every 3 days). The treatment was

prescribed to last for one year. The child will undergo clinical follow-ups throughout his early childhood.

DISCUSSION

The detection of acquired toxoplasmosis in a 6-month-old nursing infant is very rare because exclusive breastfeeding represents a protective factor against contaminated food. Sucking on a piece of undercooked beef at two months of age was probably how this infection was transmitted. This type of transmission in such a young infant has not yet been reported in the literature. The ingestion of contaminated water has been described as another infection route for nursing infants⁹. Another controversial factor is transmission through breast milk, which has not yet been proven¹⁰. In our case, this route was discarded because the mother remained seronegative throughout the entire period of investigation. This enabled us to confirm that the nursing infant acquired toxoplasmosis via exposure to contaminated food.

Factors associated with low socioeconomic and educational levels¹¹ and with the ingestion of raw or undercooked meat are directly related to the risk of acquiring toxoplasmosis^{12,13,14}. The mothers' cognizance of healthy eating habits and of the exclusive breastfeeding of nursing infants for the first six months of life, followed by predominant breastfeeding complemented with food until children are two years old, is extremely important to ensure their health and protect them from foodborne infections such as toxoplasmosis^{14,15,16}. Infected infants should be monitored for a period of at least one year by means of periodic eye examinations and serology assays, as well as by the application of treatments with pyrimethamine, sulfadiazine and folic acid^{3,4}.

CONCLUSIONS

Toxoplasmosis may be acquired by nursing infants in the first months of life if they are exposed to risk factors such as sucking on raw or undercooked meat. Confirmation of the infection is done through molecular and serological analysis, which also enables the phase of infection to be determined.

Health education preventive measures are needed to inform pregnant women and mothers of the importance of exclusive breastfeeding of nursing infants, given the lack of knowledge about the transmission mode of toxoplasmosis and other foodborne

infections that are risk factors for the child. It is important to carefully assess epidemiological information provided by patients, and to carry out serological analyses to confirm toxoplasmosis in nursing infants, especially in cases presenting lymphadenitis accompanied by fever.

ETHICAL APPROVAL

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Goiás under Protocol no. 943.441.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Gelaye W, Kebede T, Hailu A. High prevalence of anti-*Toxoplasma* antibodies and absence of *Toxoplasma gondii* infection risk factors among pregnant women attending routine antenatal care in two Hospitals of Addis Ababa, Ethiopia. *Int J Infect Dis*. 2015;34: 41-45.
2. Carvalho CM; Farhat, CK. Toxoplasmose Adquirida. *J Ped*. 1999; 75, Supp 1: 63-67.
3. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;107:815-828.
4. Avelino MM, Amaral WN, Rodrigues IM, Rassi AR, Gomes MB, Costa TL, et al.. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. *BMC Infect Dis*. 2014; 14:1-13.
5. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2002; 185: 73-82.
6. Fonseca ZC, Rodrigues IM, Melo NC, Castro AM, Avelino MM. Importância do teste de avidéz IgG na toxoplasmose congênita. *Rev Patol Trop*. 2016; 45:42-54.
7. Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors*. 2015; 8:292.
8. Emelia O, Rahana AR, Mohamad FA, Cheng HS, Nursyairah MS, Fatinah AS, et al. IgG avidity assay: A tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women. *Trop Biomed*. 2014;31: 633-640.
9. Capobianco JD, Mitsuka-Breganó R, Monica TC, Ferreira FP, Reiche EM. Acute toxoplasmosis in a breastfed infant with possible transmission by water. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015; 57:523-526.

10. Bonametti AM, Passos JN, Koga da Silva EM, Macedo ZS. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *J Trop Pediatr*.1997; 43:116.
11. Bollani, L, Stronati M. II Neonato con toxoplasmosi congenita: clinica, terapia e follow-up. *JPNIM*. 2014; 3:1–7.
12. Bonametti AM, Passos JN, Silva EM, Bortoliero AL. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Rev Soc Bras de Med Trop*. 1997; 30: 21-25.
13. Avelino MM, Campos DJr, Parada JB, Castro AM. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. *Braz J Infect Dis*. 2004;8:164-174.
14. SVS. Secretaria de vigilância em saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. 2006;1:1-5.
15. Dupont E, Dietrich MV, Frizzo RA, Ribeiro LE, Vitoria AM. Análise temporal do aleitamento materno em Unidade Básica de Saúde de Pelotas, Brasil. *Rev Med São Paulo*. 2017; 96:35-38.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Saúde da criança: crescimento e desenvolvimento. (Caderno 33). 2012.

Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats

Avaliação da acurácia de técnicas parasitológicas para o diagnóstico de parasitos intestinais em gatos

Hanstter Hallison Alves Rezende^{1*}; Juliana Boaventura Avelar¹; Heloísa Ribeiro Storchilo¹; Marina Clare Vinaud¹; Ana Maria de Castro¹

¹ Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro – LAERPH, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil

Received February 12, 2015

Accepted April 27, 2015

Abstract

The accuracy of the parasitological techniques of Willis, Hoffman-Pons-Janer or Lutz (HPLJ), Sheather and Faust was evaluated in fecal samples from stray cats caught by the Zoonosis Control Center in Goiânia, Goiás, Brazil. These four techniques were applied separately to analyze 154 fecal samples, and their accuracy was analyzed based on an evaluation of their sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and Kappa index, resulting in the selection of the Willis technique as the nominal gold standard. Of the 154 samples, 115 (74.68%) tested positive for intestinal parasites. The analysis of the frequency of positivity indicated that the HPLJ technique detected 86.1% of the positive samples and was the closest to the gold standard. The analysis of the accuracy of the techniques was evaluated using the most prevalent parasites. The Sheather technique showed the highest accuracy in the detection of Ancylostomatidae, while the Sheather and HPLJ techniques showed similar accuracies in the detection of *Cystoisospora* spp. when compared to the gold standard. Lastly, the Faust technique showed the highest accuracy in the detection of *Toxoplasma gondii* when compared to the gold standard. This study underscores the importance of combining parasitological techniques in the diagnosis of intestinal parasites in cats.

Keywords: Accuracy, intestinal parasites, parasitological techniques, stray cats.

Resumo

A avaliação da acurácia das técnicas parasitológicas de Willis, Hoffman-Pons-Janer ou Lutz (HPJL), Sheather e Faust foram realizadas em amostras fecais de gatos capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses em Goiânia, Goiás. Essas quatro técnicas foram utilizadas separadamente para análise de 154 amostras fecais. A análise de acurácia foi empregada, avaliando-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e índice *kappa*, sendo a técnica de Willis eleita como padrão-ouro. Das amostras analisadas 74,68% (115/154) foram positivas para enteroparasitos. A análise de frequência de positividade demonstrou que a técnica HPJL detectou 86,1% dos positivos, aproximando-se do padrão-ouro. A avaliação da acurácia foi realizada pela análise dos parasitos mais prevalentes, sendo que, para Ancylostomídeos, a técnica de Sheather apresentou melhor acurácia; para *Cystoisospora* spp., as técnicas de Sheather e HPJL foram semelhantes e para *Toxoplasma gondii*, a técnica de Faust apresentou melhor acurácia comparada ao padrão ouro. Este estudo demonstra a importância da associação de técnicas parasitológicas para o diagnóstico de enteroparasitos em gatos.

Palavras-chave: Acurácia, enteroparasitos, técnicas parasitológicas, gatos errantes.

Introduction

Cats play an important role in the transmission of zoonotic agents, especially of heteroxenous parasites that may infect humans, leading to important public health diseases such as cutaneous larva migrans, visceral larva migrans, toxoplasmosis, giardiasis and

cryptosporidiosis, among others (SCHANTZ, 1991; MCCARTHY & MOORE, 2000; SERRA et al., 2003). Several diagnostic techniques have been used in order to identify the different parasite stages, thus providing a more reliable diagnosis. The techniques most commonly employed are: zinc sulfate centrifugal flotation (Faust), flotation in saturated sodium chloride solution (Willis), spontaneous sedimentation (Hoffman-Pons-Janer-Lutz), and the formol ether concentration technique (DE CARLI, 2001;

*Corresponding author: Hanstter Hallison Alves Rezende, Tropical Pathology and Public Health Institute, Universidade Federal de Goiás – UFG, Rua 235, s/n, Setor Universitário, CEP 74650-050, Goiânia, GO, Brasil.
e-mail: hanstter.bio@hotmail.com

Anexo 5 - Artigo em colaboração durante o curso de doutorado

ANÁLISE DA ACURÁCIA DE DIFERENTES TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS NO DIAGNÓSTICO DE PARASITOS ENTÉRICOS DE GATOS (*Felis catus domesticus*) ERRANTES E DOMICILIADOS EM GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL

ANALYSIS OF THE ACCURACY OF DIFFERENT LABORATORY METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF INTESTINAL PARASITES FROM STRAY AND DOMICILED CATS (*Felis catus domesticus*) IN GOIÂNIA, GOIÁS, BRAZIL

ABSTRACT

Jaqueline Ataíde Silva Lima, Hanstter Hallison Alves Rezende, Tamires Mariana
Dias Dama Rocha, Ana Maria de Castro.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 2017 (Aceito).

Cats are carriers of zoonotic agents to humans, including intestinal parasites. The purpose of this study was to analyze the accuracy of different laboratory methods for the diagnosis of intestinal parasites. Fecal samples were processed by the Willis, Sheather, Faust and Hoffman-Janer-Pons-Lutz (HJPL) methods. Accuracy analysis was performed determining the sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and *Kappa*. A total of 149 fecal samples were collected, 65 from stray cats and 84 from domiciled cats. The prevalence of intestinal parasites in stray cats was 60% while in domiciled cats it was 17%. In the analysis of accuracy, the techniques that showed the greatest accuracy for Ancylostomids were Willis and Faust, for *Cystoisospora* spp Sheather with Faust or HPJL, and *Toxoplasma gondii* / Hammondia hammondi the association between Willis and Faust. Therefore, for a reliable evaluation of the prevalence of intestinal parasites, at least two different techniques should be used in parasitological exams of feces.

Keywords: Cats, clinical laboratory techniques, parasitic diseases.

RESUMO

Gatos são veiculadores de agentes zoonóticos para o homem, entre eles os parasitos intestinais. O objetivo foi analisar a acurácia de diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico de parasitos entéricos. As amostras de fezes foram processadas pelos

métodos de Willis, Sheather, Faust e Hoffman-Janer-Pons-Lutz (HJPL). A análise de acurácia foi realizada determinando a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e índice *Kappa*. Foram coletadas 65 amostras de fezes de gatos errantes e 84 amostras de gatos domiciliados, total de 149 amostras. A prevalência de parasitos entéricos nos errantes foi 60% e nos domiciliados 17%. Na análise de acurácia as técnicas que associadas apresentaram maior acurácia para Ancilostomídeos foram Willis e Faust, para *Cystoisospora* spp Sheather com Faust ou HPJL, e *Toxoplasma gondii*/*Hammondia hammondi* a associação entre Willis e Faust. Portanto, para uma avaliação fidedigna da prevalência de parasitos entéricos, deve-se usar no mínimo duas técnicas diferentes ao realizar os exames parasitológicos de fezes.

Palavras-chave: Gatos, técnicas de laboratório clínico, doenças parasitárias.

INTRODUCTION

Domestic and stray cats are responsible for environmental contamination and may be responsible for the transmission of zoonotic. In this respect, few studies have compared the zoonotic potential of these two groups of animals (GENNARI et al., 1999; SERRA et al., 2003).

Cats are carriers of parasites therefore enlarging the risk of environmental contamination. Human contact with feces of infected animals is considered a public health problem due to the possibility of zoonotic transmission (TESSEROLLI et al., 2005; BRENER et al., 2005; JOFFILY et al., 2013; BEIGE et al., 2017; LIMA et al., 2017).

The diagnosis of such parasitic infections is of utmost importance due to the possibility of transmission and environmental contamination. Therefore adequate laboratory techniques that present good sensitivity, specificity and reproducibility are necessary. The evaluation of the accuracy of different parasitological techniques allows the determination of concordance and reproducibility for application in veterinary laboratories. Thus the aim of this study was to analyze the accuracy of different laboratory methods for the diagnosis of intestinal parasite from stray and domestic cats and determine the prevalence of the detected parasites (REZENDE et al.; 2015; STULL et al., 2015).

Given the possibility of transmission of intestinal parasites by cats, and their role in environmental contamination, laboratory techniques with good sensitivity, specificity

and reproducibility are necessary to diagnose such parasites. The evaluation of the accuracy of different parasitological techniques allows to determine their agreement and reproducibility for application in the veterinary laboratory, being the main objective of this work, the indication of techniques to produce reliable information about the real prevalence of intestinal parasites in the study population.

MATERIAL AND METHODS

Study

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Goiás, under Protocol nos. 054/2013 and 024/2016. The animals were divided in two groups: domiciled and stray. Domiciled cats were animals living in houses or apartments with their owners, while the stray cats were captured by the Zoonosis Control Center (ZCC) in Goiânia and by a non-governmental organization (NGO) animal protection. Two groups of cats of different ages and both sexes, from Goiânia, in the state of Goiás, Brazil, were analyzed. In the group of stray cats, 33 were females and 32 males. 32 were less than one year old and 32 were over 1 year old. Of the domiciled cats, 49 were females and 35 males. 40 were less than one year old and 44 were older than 1 year.

The samples were collected on demand, totaling 149 fecal samples, 65 from stray cats and 84 from domiciled cats. The sampling period started in March 2015 and ended in May 2016. Stray cat fecal samples were collected directly from the animals' cages before they were dewormed, and the samples from the domiciled animals were collected by their owners. All the samples were stored in sterile universal containers, and care was taken not to use samples contaminated with soil.

Analysis of samples

The techniques used in this study were Sheather, Hoffman-Janer-Pons or Lutz (HPJL), Faust and Willis, used to identify protozoan cysts and oocysts, helminth eggs and larvae in the cat feces.

Statistical analysis

An evaluation was made of the occurrence of intestinal parasites, and the frequency of positivity for each parasite and for each technique. To evaluate the diagnostic tests, the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and *Kappa* (*K*) of each technique were compared each other. The X^2 test was applied to evaluate the statistical correlation between the prevalence of parasites in the

groups of stray and domiciled cats. The parasitological results were analyzed using Epi Info 3.2.1 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Of the total of 149 fecal samples, 65 came from stray cats and 84 from domiciled cats. Of the 65 fecal samples from stray cats, 60% were positive, while of the 84 fecal samples from domiciled cats, 17% were positive.

The test X^2 revealed a significant difference between the groups, $p = 0.023$ ($p < 0.05$), indicating that stray cats are more likely to have parasites than domiciled cats, which may be explained by their poor and inadequate diet, lack of antiparasitic treatment, and/or exposure to infections. This corroborates the study by Serra et al. (2003) conducted in the metropolitan region of Rio de Janeiro, which evaluated the prevalence of intestinal parasites in stray and domiciled cats and also reported a high prevalence in stray cats. The present study also corroborates data reported by the study Mattos and Viol (2013) conducted in Apucarana, PR, Brazil, where the prevalence of intestinal parasites was higher in cats that had free access to the street than in cats restricted to living indoors.

The X^2 test was also applied to sex and age between the groups of stray and domiciled cats and in each specific group, revealing no significant difference. As for types of parasites, the comparison between mono-parasitized stray and domiciled cats also revealed no significant difference.

The parasitological analysis of the cats' feces using different methods enabled the identification of intestinal parasites in 53 fecal samples. The Willis technique enabled the detection of 83% (44/53). The Faust technique enabled the detection of 74% (39/53) of the positives, followed by the HPJL technique with 46% (24/53) and the Sheather technique with 44% (23/53). An analysis was made of the frequency of positivity by each technique in the 53 positive samples from both stray cats (39 positive) and domiciled (14 positive).

The analysis of the frequency of positivity of the parasitological techniques indicated that the Willis technique presented the best performance (83%), reinforcing the use of this technique as a gold standard. This is in line with the studies of Táparo et al. (2006), and Ross et al. (2014), who reported the good performance of the Willis technique applied to eggs, cysts and oocysts (REZENDE et al., 2015). The Faust technique

obtained a frequency of positivity (74%), while the Sheather technique presented the lowest frequency of positivity (44%). None technique was able to detect 100% of the positive cases, reinforcing the need to use more than one diagnostic technique. The combined use of several methods is useful to detect intestinal infections caused by parasites, particularly helminths and protozoa, increasing the accuracy of the laboratory diagnosis (MENEZES et al., 2013).

Rezende et al.'s study (2015) demonstrated that the HPJL technique detected more positives, while the Faust technique presented the lowest frequency of positivity. However, their finding is discrepant with the present study, in which the Faust technique was achieved better performance. The inconsistency between the results of the present study and those reported by Rezende et al. (2015) can be explained by the fact that the study population was different, since Rezende et al. (2015) evaluated only stray cats and the present study analyzed two cat populations: stray and domiciled.

In the current study, it was found that associating the Willis with the Faust technique can increase the diagnostic efficacy. This finding diverges from that reported by Rezende et al. (2015) and Ribeiro et al. (2015), who recommend associating the Willis technique with the HPJL technique in veterinary clinical and laboratory diagnosis.

The accuracy of the HPJL, Faust, Sheather and Willis parasitological techniques were compared for the diagnosis of *Ancylostoma* sp. eggs. The association of the techniques that presented the greatest precision were Willis and Faust, with 75% sensitivity and 99.1% specificity, PPV of 96%, NPV of 93.5% and *Kappa* (0.805) (Table 1).

Table 1. Evaluation of the association of the Sheather, Faust and Hoffman -Pons - Janer -Lutz techniques and Willis technique for the diagnosis of *Ancylostoma* sp.

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Kappa
Willis + Sheather	38,9%	97,3%	82,4%	83,3%	0,411
Willis + Faust	75,0%	99,1%	96,0%	93,5%	0,805
Willis + HPJL	34,4%	100,0%	100,0 %	84,8%	0,451
Sheather + Faust	86,7%	91,8%	54,2%	98,4%	0,619
Sheather + HPJL	12,5%	93,2%	18,2%	89,9%	0,060
Faust + HPJL	32%	97,6%	72,7%	87,7%	0,381

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value, HPJL: Hoffman - Pons - Janer -Lutz.

The study by Cerqueira et al. (2007), which compared the efficiency of the Willis technique to that of the HPJL method in the diagnosis of *Ancylostomatidae*, found that the HPJL technique was more sensitive than the Willis technique. In the present study, HPJL associated with the other techniques did not have a good performance, and the *Kappa* showed weak agreement. However, the Faust and Willis technique displayed a better performance (75% sensitivity and *Kappa*=0.805), and was considered more suitable for the diagnosis of Ancylostomids, because this parasite has light eggs. Souza-Dantas et al. (2007) demonstrated the importance of using the Faust technique, which reached 100% sensitivity in comparison to necropsy of the intestinal tract of cats. Coelho et al. (2013) also obtained a good performance using Faust compared in other techniques used in its diagnosis of *Ancylostomatidae*.

The of centrifugal flotation technique with zinc sulfate (Faust's Technique) is a technique of choice in the detection of light structures. It can also be used in the detection of heavy eggs, which suggests it is a technique with good diagnostic sensitivity (FAUST et al., 1938; DUBEY, 1993; CARLETON & TOLBERT, 2004; DRYDEN, 2005). This finding differs from that reported by Rezende et al. (2015), who found that the Sheather technique exhibited higher sensitivity in the diagnosis of *Ancylostomatidae*.

Analyzing the precision of the diagnosis of *Cystoisospora* spp. Oocysts, Sheather and Faust presented higher precision, 100% sensitivity, 97.2% specificity, 55.6% PPV, 100% NPV and *Kappa* 0.701), demonstrating very good agreement. The Sheather and HPJL techniques showed similar accuracy, with 100% sensitivity, specificity of 98.6%, PPV of 66.7%, NPV of 100% and *K* (0.793), demonstrating a very good agreement (Table 2). The present study reinforces the use of the HPJL technique associated with Sheather technique, which corroborates the finding of Rezende et al. (2015), who stated that the HPJL technique presented higher sensitivity in the diagnosis of *Cystoisospora* spp. Garcia (2007) recommended associating the HPJL technique with the Willis or Sheather technique for the diagnosis of *coccidia* in routine laboratory tests.

Table 2. Evaluation of the association of the Sheather, Faust and Hoffman -Pons - Janer -Lutz techniques and Willis technique for the diagnosis of *Cystoisospora* spp.

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Kappa
Willis + Sheather	28,6%	100,0%	100,0%	93,1%	0,420
Willis + Faust	38,5%	98,5%	71,4%	94,4%	0,467
Willis + HPJL	42,9%	99,3%	85,7%	94,4%	0,542
Sheather + Faust	100%	97,2%	55,6%	100%	0,701
Sheather + HPJL	100%	98,6%	66,7%	100%	0,793
Faust + HPJL	62,5%	99,3%	83,3%	97,9%	0,700

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value, HPJL: Hoffman - Pons - Janer -Lutz.

Analyzing the results of accuracy for oocysts of *T. gondii/H. hammondi*, the Faust technique association whit Willis demonstrated the/ highest sensitivity of 92.9%, specificity o 94.8%, PPV of 65%, NPV of 99.2% and *Kappa* (Table 3). In Rezende et al.'s study (2015), the Faust technique also exhibited higher sensitivity in the diagnosis of oocysts of *T. gondii/H. hammondi*, denoting the good performance of this technique. Flotation techniques in saturated solutions are recommended for oocysts and show good diagnostic sensitivity (SHEATHER, 1923; FAUST et al., 1938; DRYDEN, 2005). Therefore, for the diagnosis of oocysts of *T. gondii/H. hammondi*, we recommend using the Willis technique associated with the Faust technique, or the Willis technique associated with the Sheather method, where *Kappa*=0.735 demonstrates good agreement.

Table 3. Evaluation of the association of the Sheather, Faust and Hoffman -Pons - Janer -Lutz techniques and Willis technique for the diagnosis of *Toxoplasma gondii/Hammondia hammondi*.

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Kappa
Willis + Sheather	50,0%	99,2%	85,7%	95,6%	0,607*
Willis + Faust	92,9%	94,8%	65,0%	99,2%	0,735*
Willis + HPJL	28,6%	98,5%	66,7%	93,0%	0,364*
Sheather + Faust	87,5%	92,2%	38,9%	99,2%	0,501*
Sheather + HPJL	50%	97,9%	57,1%	97,2%	0,508*

Faust + HPJL	35,3%	99,2%	85,7%	92,3%	0,464*
--------------	-------	-------	-------	-------	--------

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value, HPJL: Hoffman - Pons - Janer -Lutz.

In conclusion, the association of parasitological techniques is fundamental for greater precision in the diagnosis of intestinal parasites. As expected the prevalence of intestinal parasites in stray cats was higher than that found in domiciled cats reinforcing their role as sources in the environmental contamination

REFERENCES

- Brener B, Mattos DPBG, Lisboa L, Arashiro EKN, Millar PR, Sudré AP et al. Frequência de enteroparasitas em amostras fecais de cães e gatos dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói. *Rev Bras Ciênc Vet* 2005; 12(1): 102-105.
- Carleton RE, Tolbert MK. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminthes in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia. *Vet Parasitol* 2004; 119(4): 319-326.
- Castro JM, Santos SV, Monteiro NA. Contaminação de canteiros da orla marítima do município de Praia Grande, São Paulo, por ovos de *Ancylostoma* e *Toxocara* em fezes de cães. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(2): 199-201.
- Cerqueira EJJ, Arcano MS, Alcântara LM. Análise comparativa da sensibilidade da técnica de Willis, no diagnóstico parasitológico da ancilostomíase. *Diálogos e Ciência* 2007; 5:1-7.
- Coelho WMD, Gomes JF, Amarante AFT, Bresciani KDS, Lumina G, Koshino-Shimizu S, Leme DP, Falcão AX. A new laboratorial method for the diagnosis of gastrointestinal parasites in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2013; 22 (1): 1-5.
- Dryden MW. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet Therap* 2005; 6(1): 15-28.
- Dubey JP. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other cyst forming coccidia of humans and animals. In: Kreier, *J P Paras Protoz* 1993; 4(4): 1-57.
- Faust ED, D'antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Preliminary communication. *Am J Trop Med* 1938; 18: 169-183.

Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. *ASM Press* 2007;5.

Gennari SM, Kasai M, Pena HFJ, Cortez A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci* 1999; 33(2): 87-91.

Hoffman WA, Pons JA, Janer, JL. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *J Public Health Trop Med* 1934; 9: 283-298.

Joffily D, Souza LM, Gonçalves SM, Pinto JV, Barcellos MCB, Alonso LS. Medidas para o controle de animais errantes desenvolvidas pelo grupo Pet Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. *Rev Em Ext* 2013; 12(1): 197-211.

Lima MCF, Mittestainer C, Rocha PB, Carvalho ER, Verotti BD, Pellicciari PR et al. Principais zoonoses em pequenos animais: breve revisão. *Vet Zootec* 2017; 24(1): 84-106.

Mattos BB, Viol BM. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos domiciliados. *Rev Biol Farm* 2013; 7(1).

Menezes RAO, Gomes MSM, Barbosa FHF, Machado RLD, Andrade RF, Couto AAR. Sensibilidade de métodos parasitológicos para o diagnóstico das enteroparasitoses em Macapá – Amapá, Brasil. *Rev Biol Ciênc Terra* 2013; 13(2).

Rezende HHA, Avelar JB, Storchilo HR, Vinaud MC, Castro AM. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015; 24(4): 471 – 474.

Ribeiro ES, Amarante AFT, Serrano ACM, Táparo CV, Pierucci JC, Matos LVS et al. Diagnosis of gastrointestinal parasites in cats: a comparison of different methodologies. *Acta Vet Bras* 2015; 9(4): 381-385.

Ross M, Schmitt BAM, De-Paula D, Tomazzi RC, Cecchin RS, Kunh F et al. Prevalência de ovos, larvas, cistos e oocistos de parasitos com potencial. *Rev Pat Trop* 2014; 43(3): 341-350.

Santarem VA, Sertor IF, Bergamo FMM. Contamination by *Toxocara* spp. eggs in public parks and squares in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31(6): 529-532.

Scaini CJ, Toledo RN, Lovatel R, Dionello MA, Gatti FA, Susin L et al. Environment contamination by helminth eggs and larvae in dog feces from central area of Cassino Beach, Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(5): 617-619.

Serra CMB, Uchôa CMA, Coimbra RA. Exame parasitológico de fezes de gatos (*Felis catus domesticus*) domiciliados e errantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(3): 331-364.

Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *J Comp Ther.* 1923; 36: 266-275.

Souza-Dantas LM, Bastos OPM, Brener B, Salomão M, Guerreiro J, Labarthe NV. Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de helmintos gastrintestinais de gatos domésticos. *Ciência Rural* 2007; 37(3): 904-906.

Stull JW, Brophy J, Weese JS. Reducing the risk of pet-associated zoonotic infections. *Can Med Assoc J* 2015, 187:10.

Táparo CV, Perri SHV, Serrano ACM, Ishizaki MN, Costa TPD, Amarante AFT et al. Comparação entre técnicas coproparasitológicas no diagnóstico de ovos de helmintos e oocistos de protozoário em cães. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 1:1-5.

Tesserolli GL, Fayzano L, Agottani JVB. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de cães e gatos, Curitiba-PR. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient* 2005; 3:31-34.

Anexo 6 - Artigo em colaboração durante o curso de doutorado

Epidemiological factors associated with *Toxoplasma gondii* infection of postpartum women treated in the public healthcare system of Goiânia, Goiás, Brazil

Juliana Boaventura Avelar, Marcos Gontijo da Silva, Hanstter Hallison Alves Rezende, Heloísa Ribeiro Storchilo, Waldemar Naves do Amaral, Isolina Rodrigues Xavier, Mariza Martins Avelino, Ana Maria de Castro

Revista da Sociedade de Medicina Tropical 2017 (Aceito).

ABSTRACT

Introduction: Knowledge about the epidemiological profile and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among postpartum women is relevant because this protozoan can be congenitally transmitted and congenital toxoplasmosis can cause severe and disabling disease in the developing fetus. Assess the risk factors associated with *T. gondii* infection in postpartum women in Goiânia, GO, Brazil. **Methods:** This is a cross-sectional study comprising 229 postpartum women, among whom 204 were chronically infected (IgG+/IgM-) and 25 were seronegative (IgG-/IgM-), thus constituting the control group. All the patients were asked to fill out a form to provide sociodemographic, clinical, eating habits and cultural information. The data were analyzed to compare seropositivity and risk factors based on the odds ratio. **Results:** The sociodemographic characteristics associated with the risk for toxoplasmosis were: education ≤ 8 years (OR: 2.521, CI: 1.012-6.301, p: 0.049), age range ≥ 30 years (OR: 4.090; CI: 1.180-14.112, p: 0.023), has lived in Goiânia for over 12 months (OR: 6.964; CI: 1.495-32.536, p: 0.025). The characteristics related to eating habits, clinical and behavioral aspects were not found risk factors associated with the positive test for toxoplasmosis. **Conclusion:** Our findings are in agreement with the results of other studies conducted in Brazil and abroad, which indicate that variables such as low

schooling, advanced age and consumption of raw or undercooked meat are major risk factors for pregnant women to become infected with *T. gondii*.

Key words: *Toxoplasma gondii*, postpartum women, Diagnosis, Risk factors

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is one of the main factors responsible for neonatal morbidity and mortality¹. Knowledge about the factors responsible for the dissemination of *T. gondii* among postpartum women is important because, when acquired congenitally, this disease can trigger lesions with severe sequelae in newborns^{2,3}.

Pregnant women in the chronic stage of infection by *T. gondii* may experience worsening of the disease⁴⁻⁶ or even become reinfected⁷. The etiologic agent of toxoplasmosis can reach the placenta hematogenously, can potentially infect the fetus and give rise to congenital toxoplasmosis⁸. This infection can kill the fetus or to cause changes that aggravate the health of surviving children⁹. Several clinical alterations such as seizures only appear after the second or third decade of life, and previous studies have shown that 80% of children with subclinical infection present ocular sequelae at some point in their lives. Therefore, a child that is asymptomatic at birth does not indicate a better prognosis^{2,10,11}.

Given that one of the main mechanisms of dissemination is through the ingestion of different evolutionary forms of the parasite, infection can occur through the ingestion of *T. gondii* oocysts and/or cysts. Toxoplasmosis can be considered a foodborne disease, with the exception of congenital infection. Knowledge about the factors of exposure to *T. gondii* to be studied should be based on knowledge about the biological cycle of the agent, i.e., on the possible forms of ingestion of oocysts that are

present in the environment, or tissue cysts contained in the meat of animals consumed by humans¹².

Habits, behaviors, characteristics and procedures that cause this contamination are considered risk factors^{13,14}. However, the relationship between humans and parasite may remain harmless if appropriate prophylactic measures are taken. Therefore, this paper proposes to identify the risk factors for toxoplasmosis in postpartum women treated in the public healthcare system (SUS) in the municipality of Goiânia, state of Goiás, Brazil.

2. METHODS

This is a cross-sectional analysis of toxoplasmosis among postpartum women chronically infected by *T. gondii*, aiming to assess the risk factors for this infection.

The research project was submitted to and approved by the Ethics Committee of the Hospital das Clínicas (clinical hospital) of UFG, under Protocol no. 142/2009, in conformity with the ethical and legal aspects of research involving humans established by Resolution 466/12 of the National Health Council¹⁵.

Two public maternity wards were chosen in Goiânia (16°40'49" S 49°15'23" W), namely, the maternity ward of the Hospital das Clínicas (HC) of UFG, which is a reference for gestation risks, and the Maternidade Nossa Senhora de Lourdes (MNSL), a reference for normal pregnancies. All the participants of this study were treated in the public health network of the municipality of Goiânia, Goiás between February 2010 and July 2011.

The parameters for estimating sample size were: prevalence of 70%, level of reliability (type I error) of 5% and level of accuracy of 0.6%. So a minimum of 224 women would be required. The pregnant women were selected during their admission

to the maternity wards. So as not to interfere in the routine health care of the service, postpartum women were invited to participate in the study after giving birth in one of these maternity wards. Signed consent was obtained and interviews were conducted individually after the patient had undergone her medical procedure and/or nursing care, thus ensuring the participant's privacy.

The eligibility criteria for participation in the study were to be a postpartum women and to agree to participate by signing a free, prior and informed consent (FPIC) form.

Two hundred and seventy-two postpartum women were invited to be part of the study, 32 of whom did not agree to participate and 11 cases were discarded due to inconsistencies in the serological results, thus there was a loss of 43 cases (15.92%). The probabilistic sample consisted of 229 puerperal women, of which 121 were from the HC-UFG and 108 from the MNSL, both from the urban area of the city of Goiânia, Goiás. Considering the 229 puerperal women, 204 were IgG positive, forming the group of cases and 25 were negative.

After the interview, a 5 ml aliquot of venous blood was collected from each patient for an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of IgG and IgM. The exclusion criterion was when a pregnant woman did not consent to give a blood sample, thus excluding her as a participant.

The purpose of the immunoenzymatic assay (ELISA for the detection of IgM and IgG), which was performed using Katal[®] kits, was to confirm the presence or absence of anti-*T. gondii* antibodies in the 229 blood samples.

The event considered for analysis was positivity for ELISA IgG or IgM (dependent variable) in any titer above the cutoff point, as recommended by the manufacturer. For the purpose of analysis, the variables obtained from the

questionnaires and medical records were grouped as follows (independent variables): 1) sociodemographic characteristics (ethnicity, level of education, marital status, age, family income, place of residence, work, number of pregnancies); 2) Eating habits (consumption of meat, raw or undercooked meat, filtered or mineral water); 3) behavioral habits (owns or owned cats or dogs).

A statistical analysis was performed using BioEstat[®] v. 5.3 software. The database was built using the Epi Info[™] 3.3.2 program, and the variables were subjected to frequency distribution to build the profile of the study participants. The toxoplasmosis prevalence rate in the sample under study was estimated by dividing the number of ELISA positive cases by the total number of exams, with a 95% confidence interval (95% CI)^{16, 17}.

The independent effect among the selected variables was determined and the ELISA positivity was determined using a univariate logistic model to estimate the odds ratio (OR) with a 95% CI among the subgroups formed from each variable¹⁸.

3. RESULTS

Of the eligible sample (n = 229), 204 or 89.02% (95% CI: 87.37 to 94.37) were IgG positive for toxoplasmosis, while 25 or 10.92% (95% CI: 8.37 to 14.37) were seronegative and so constituted the control group of the study. No pregnant women were found with IgM class antibodies. Thus indicating the high prevalence rate of *T. gondii* infection in Goiânia, Goiás¹⁰.

The sociodemographic characteristics that were significantly associated with the risk for toxoplasmosis ($p < 0.05$) in this group were: being 30 years or older, living in Goiânia for one year or more, and having less than 8 years of schooling, as shown in Table 1.

The characteristics related to eating habits, clinical and behavioral aspects were not found risk factors associated with the positive test for toxoplasmosis ($p < 0.05$), which are highlighted in bold font in Table 2.

4. DISCUSSION

Knowledge about the sociodemographic profile of the population of women of childbearing age is very important for the formulation of primary and secondary health care actions to deal with toxoplasmosis. This evaluation is important in Brazil which is continental country with clear ethnic and social differences, these factors must be taken into account by the public health management organizations.

The main risk factors for this infection which the literature describes include: age, educational level and eating habits, as demonstrated in this study. A piece of information that corroborated the surveys published in the literature was the correlation between toxoplasmosis seroprevalence and age, which was similar to findings from most surveys that included this type of analysis, not only in postpartum women and women of reproductive age but also in the general population¹⁹⁻²¹. Positive seroprevalence is more relevant after 31 years of age, according to the literature and confirmed in this study, in which seroprevalence in the age group over 30 years represented the majority (64.2%), and in other national studies (58.7% and 70.8%, respectively)^{20, 22-24}. The seroprevalence of *T. gondii* is higher in older people than young ones, due to the longer exposure time, so they are more susceptible of contamination by the different infective forms of *T. gondii*^{25,26}.

Although the non significant results considering the residents in Goiânia, we consider an important risk factor to correlate with infection by *Toxoplasma gondii*, which is explained by the high prevalence rate of toxoplasmosis in the population of this municipality^{2, 10, 11, 27-29}. Since the 1970s it was demonstrated that in Goiânia,

toxoplasmosis was present in high prevalence, with 54.76% of the seropositive population³⁰. And that despite all the improvements in health programs, after four decades, seroprevalence remains high³¹.

The educational level of postpartum women appeared as a significant risk factor for this parasitic infection in women with fewer than eight years of schooling (OR: 2.521). This inverse association supports the hypothesis that low educational levels increase the exposure to risk because of failure to adopt better food-related hygiene measures, and this in turn underscores the importance of investments aimed at access to and quality of education as a means to promote public health^{24, 27}.

With regard to the association relationship between behavioral, eating habits and positivity for toxoplasmosis, current or past ownership of dogs and consumption of raw or undercooked meat were not identified as risk factors³². A factor that differs from other studies was the fact that no relation was found between owning dogs or cats with *T. gondii* contamination. Cats can disseminate oocysts in the environment, while dogs can act as mechanical vectors by assisting in the transmission of *T. gondii* oocysts adhered to their hair^{11, 33}.

Another factor known to be associated with toxoplasma infection is living with cats, which was not recorded in this survey. National and international epidemiological studies are not consistent concerning the association between *T. gondii* infection and living with cats. The results of this study are in agreement with those reported in Ireland³⁴ and Recife³⁵, where this association was also not significant. However, they differ from findings reported in Goiânia¹¹, Tocantins¹⁴ and in the region of the Upper Uruguay River²³, where a significant association ($p < 0.05$) was found with seropositivity in pregnant women.

As for studies carried out abroad, the findings of this study are comparable to those reported in Europe³⁶, Venezuela³⁷ and the United States¹, which did not reveal a correlation between seropositivity and living with cats. According to the authors, the possibility of a person becoming infected by touching cats is negligible or nonexistent. There may be a risk of infection only through direct contact with the feces of cats that are eliminating oocysts after their initial first infection. Moreover, cat feces must be in the environment for at least 24 hours for the oocyst to sporulate and become infectious. Collecting newly deposited feces and discarding them in the toilet does not pose a risk for infection, nor does daily cleaning of the cat's litter box. Moreover, pets kept in confinement, which do not hunt and are fed with cooked meat and processed cat food, are not at risk of becoming infected^{36,37,1}. However, a recent study in Ethiopia found an association between contact with cats and *T. gondii* infection in pregnant women, and also the contact of this group of women with soil³⁸.

Most published studies have found a direct correlation between the consumption of raw food and toxoplasma infection, a correlation that was not found in this study. In animal based foods, *T. gondii* has been found encysted in pig, sheep and goat tissues more often than in the tissues of other domestic animals. However, viable *T. gondii* is rarely found in beef, and to date, the importance of beef in the epidemiology of *T. gondii* infection is uncertain^{16,39}. A study in cattle in the State of Goiás showed that 100% of the animals evaluated had positive serology for *T. gondii*⁴⁰.

In a multicenter European study, the main risk factor for infection among pregnant women was found to be the consumption of raw or undercooked meat in 30% to 63% of cases³⁶. The consumption of these foods at least once a month increases the risk of *T. gondii* infection three-fold⁴¹. In a study conducted in the state of Tocantins,

Brazil, involving 338 pregnant women, handling meat was found to be associated with *T. gondii* infection¹⁴.

Knowledge about risk factors and life habits that favor *T. gondii* infection is important in planning educational programs aimed at reducing the incidence of toxoplasmosis during pregnancy. The best measures to prevent toxoplasmosis are primary prevention measures, which are basically characterized by education and public health programs recommended to pregnant women through campaigns, lectures, pamphlets and guidance by health care teams, aimed at avoiding contact with potentially harmful materials contaminated through contact with dogs and cats, and avoiding the consumption of raw or undercooked meat. The use of gloves when handling soil is also emphasized. A 63% reduction in the first gestational infection can be achieved by following these recommendations during pregnancy¹¹.

This study revealed some risk factors for *T. gondii* infection of the population of postpartum women. Probably a great number of controls in the study could demonstrate other risk factors for *T. gondii* infection be under-schooled and over 30 years old.

Knowledge of toxoplasmosis risk factors is important for planning and designing control measures in primary care. Such measures should be adopted to minimize failures in the diagnosis of congenital transmission diseases as well as the early detection of infected children. A limitation found in the study refers to the approach to women immediately after delivery or within 24 hours after delivery, as authorizations were required for the collection of blood from their respective newborns. These authorizations were not always easily consented since the child was not born diagnosed with any congenital disease and many mothers were apprehensive

in authorizing the collection of blood in their children, thus demonstrating the lack of knowledge about infectious diseases of congenital transmission.

Public health services need to be better organized to provide antenatal care throughout pregnancy, as well as the minimum routine examinations recommended by the Ministry of Health in order to ensure the timely and proper treatment of infected patients.

Financial Support

The authors gratefully acknowledge the Brazilian research funding agencies CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and FAPEG (Goiás State Research Foundation) for their financial support of this research.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- 1- Jones JL, Kruszon-Moran D, Rivera HN, Price C, Wilkins PP. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the United States 2009-2010 and comparison with the past two decades. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(6):1135-9.
- 2- Spalding SM, Amendoeira MRR, Ribeiro LC, Silveira C, Garcia AP, Camilo-Coura L. Prospective study of pregnant women and babies with risk of congenital toxoplasmosis in municipal district of Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;31: 483-91.
- 3- Câmara JT, Silva MG, Castro AM. Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do nordeste, Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2015;37(2):64-70.

- 4- Avelar JB, Rezende HHA, Storchilo HR, Candido RR, Amaral WN, Avelino MM. Reativação da toxoplasmose durante o oitavo mês de gestação. *Renome*. 2015;4(1):57-69.
- 5- Andrade GM, Santos DV, Carellos EV, Romanelli RM, Vitor RW, Carneiro AC. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochorioiditis during pregnancy. *Rev Soc Bras Ped*. 2010;86(1):85-8.
- 6- Bachmeyer C, Mouchnino G, Thulliez P, Blum L. Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. *J Infect*. 2006;52(2):55-7.
- 7- Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis*. 2009;199(2):280-5.
- 8- Yadav RK, Maity S, Saha S. A review on TORCH: groups of congenital infection during pregnancy. *J Sci In Res*. 2014;3(2):258-64.
- 9- Moura FL, Amendoeira MRR, Bastos OMP, Mattos DPBG, Fonseca ABM, Nicolau JL. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant and postpartum women attended at public healthcare facilities in the city of Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(2):200-7.
- 10- Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, Ovlisen B, Petersen E. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996;15:799-805.
- 11- Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, Souza-JuniorVG, Botelho CA, Figueiredo MS, 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. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27:442-9.
- 12- Dubey J. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. New York: CRC Press; 2010. 21 p.

- 13- Carellos EVM, Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, Romanelli RMC, Abreu MNS . Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. PLoS One. 2014;9(2):1-9.
- 14- Rocha EM, Lopes CWG, Ramos RAN, Alves LC. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women from the state of Tocantins, northern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;46(6):773-5.
15. Ministério da Saúde. Diretrizes e normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos. Resolução n.º 466 de 12 de dezembro de 2012. Conselho Nacional de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.
- 16 - Andrade ALSS. Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis. 2a ed. Goiânia: I; 1998. 6 p.
- 17- Bonita R, Beaglehole R, Kjellström T. Epidemiologia básica. 2a ed. Santos: Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda; 2010. 175 p.
- 18- Oliveira Filho PF. Epidemiologia e bioestatística: fundamentos para leitura crítica. 1a ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2015. 248 p.
- 19- Oliveira-Bahia L, Abreu A, Azevedo-Silva J, Oréfice F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemicacquired and congenital infection. Int J Parasitol. 2001;31:115-44.
- 20- Varella IS, Wagner MB, Darella AC, Nunes LM, Müller RW. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. J Pediatr. 2003;79(1):69-74.
- 21- Ertug S, Okayay P, Turkmen M, Yuksel H. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma* infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. BMC Public Health. 2005;5:66-76.
- 22- Aspinall T, Guy E, Roberts K, Joynson DH, Hyde JE, Sims PF. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. Int J Parasitol. 2003;33(1):97-103.

- 23- Spalding S, Amendoeira M, Ribeiro L, Silveira C, Garcia AP, Camillo-Coura L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul - Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(4):483-91.
- 24- Silva MG, Câmara JT, Vinaud MC, Castro AM. Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(4):469-75.
- 25- Strhársky J, Klement C, Hrub F. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in the Slovak Republic. *Folia Microbiol.* 2009; 54(6):553-558.
- 26- Studenicöva C, Bencăiova G, Holkova R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in a healthy population from Slovakia. *Eur J Intern Med* 2006; 17(7):470-473.
- 27- Avelino M, Campos-júnior D, Parada J, Castro AM. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(2):164-74.
- 28- Avelino M, Amaral W. Toxoplasmose e gravidez. In: Avelino M; Amaral W, editors. *Transmissão vertical, infecções congênitas*. 1a ed. Goiânia: Contato Comunicações; 2008. p. 57-112.
- 29- Cristina R, Lima M. Relação entre más-formações e óbitos fetais em decorrência de toxoplasmose congênita tratadas em uma clínica particular de Goiânia-GO. *Ensaio Cienc Cienc Biol Agrar Saúde.* 2011;15(4):53-63.
- 30- Fernandes WJ, Barbosa W. Toxoplasmose em Goiás. Comparação dos resultados da reação de Sabin-Feldman em investigação clínica e epidemiológica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1972; 1: 29-38.
- 31- Barbaresco AA, Costa TL, Avelar JB, Rodrigues IMX, Amaral NA, Castro AM. Infecções de transmissão vertical em material abortivo e sangue com ênfase em *Toxoplasma gondii*. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia.* 2014; 36(1): 17-22.
- 32- Etheredge G, Michael G, Muehlenbein M, Frenkel K. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. *Rev Panam Salud Publica.* 2004;16(3):176-86.

- 33- Dubey, JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol.* 2002;106(2):121.
- 34- Ferguson W, Mayne PD, Cafferkey M, Butler K. Lack of awareness of risk factors for primary toxoplasmosis in pregnancy. *Ir J Med Sci.* 2011; 180(4):807-11.
- 35- Porto AMF, Amorim MMR, Coelho ICN. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes atendidas em maternidade. *Rev Assoc Med Bras.* 2008;54(3):242-8.
- 36- Cook A, Gilbert R, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European research network on congenital toxoplasmosis. *BMJ.* 2000;321(7254):142-7.
- 37- Bracho L, Sanoja C, Granadillo A. Seroepidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en embarazadas. *Kasmera.* 2001;29(2):45-60.
- 38- Abamecha F, Awel H. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women following antenatal care at Mizan Aman General Hospital, Bench Maji Zone (BMZ), Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):460-8.
- 39- Dubey J. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol.* 1996;64(1-2):65-70.
- 40- Santin API, Juliano RS, Silva AC, Oliveira VSF, Junqueira-Kipnis AP, Brito WMED, Fioravanti MCS. Soroepidemiologia de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos da raça curraleiro, *Cien. anim, bras.* 2017; 18:1-8.
- 41- Buffolano W, Gilbert R, Holland F, Fratta D, Palumbo F, Ades AE. Risk factors for recent *Toxoplasma* infection in pregnant women in Naples. *Epidemiol Infect.* 1996; 116(3):347-51.

Table 1: Sociodemographic data of 204 IgG positive postpartum women and 25 patients seronegative for *Toxoplasma gondii*, treated at two maternity hospitals in Goiânia, GO, Brazil, between 2010 and 2011.

		Postpartum women IgG +		Postpartum women IgG -		OR	95% CI	P value
		no.	%	no.	%			
RACIAL PROFILE								
	Black	116	56.57%	13	52.00%	1.487	0.16-13.33	0.517
	White	70	34.34%	10	40.00%	1.167	0.13-10.72	0.585
	Asian	6	3.03%	1	4.00%	1		
	Indigenous	12	6.06%	1	4.00%	2.000	0.23-13.22	0.589
AGE								
	<30	73	35.8%	3	12.0%	1		
	≥30	131	64.2%	22	88.0%	4.090	1.18-14.12	0.023
LIVES IN								
	Goiânia	87	42.6%	9	36.0%	0.761	0.32-1.79	0.340
	Another municipality	117	57.4%	16	64.0%			
NUMBER OF PREGNANCIES								
	One pregnancy	60	29.4%	11	44.0%	1		
	Two pregnancies	58	28.4%	9	36.0%	1.181	0.46-3.06	0.460
	Multiple pregnancies	86	42.2%	5	20.0%	3.153	1.04-9.54	0.032
MONTHLY HOUSEHOLD INCOME								
	1 to 2 minimum salaries	152	74.5%	22	88.0%	0.987	0.12-8.41	0.733
	3 to 4 minimum salaries	45	22.1%	3	12.0%	2.143	0.19-23.60	0.462
	5 or more minimum salaries	7	3.4%	1	4.0%	1		
EDUCATIONAL LEVEL								
	< 8 years of schooling	101	49.5%	7	28.0%	2.521	1.01-6.30	0.033
	≥ 8 years of schooling	103	50.5%	18	72.0%	1		

no.= Absolute frequency, % = Relative frequency, OR = Odds Ratio, CI = Confidence interval

Table 2: Characteristics related to clinical and behavioral aspects and to eating habits of 204 IgG positive postpartum women and 25 patients seronegative for *Toxoplasma gondii* treated at two maternity hospitals in Goiânia, GO, Brazil, between 2010 and 2011.

	Postpartum women IgG +		Postpartum women IgG -		OR	95% CI	P value
	no.	%	no.	%			
PREVIOUS MISCARRIAGES							
Yes	43	20.8%	5	12.0%	1.068	0.38-3.01	0.569
No	161	79.2%	20	88.0%	1		
NUMBER OF MISCARRIAGES							
1 miscarriage	27	13.3	2	8.0%			
> 1 miscarriage	15	7.4%	3	12.0%			
Miscarriage through toxoplasmosis	2						
PRENATAL CHECKUPS							
Yes	184	90.2%	24	96.0%	0.383	0.05-2.99	0.302
No	20	9.8%	1	4.0%	1		
PREGESTATIONAL DISORDERS							
Yes	108	52.9%	14	56.0%	0.884	0.38-2.04	0.471
No	96	47.1%	11	44.0%	1		
OWNS OR OWNED CATS							
Yes	73	35.8%	12	48.0%	0.604	0.26-1.39	0.274
No	131	64.2%	13	52.0%	1		
OWNS OR OWNED DOGS							
Yes	137	67.2%	13	52.0%	1.887	0.82-4.36	0.180
No	67	32.8%	12	48.0%	1		
DRINKS FILTERED WATER							
Yes	137	67.8%	18	72.0%	1.220	0.48-3.07	0.055
No	67	32.2%	7	28.0%	1		
EATS							
Yes	58	28.4%	3	12.0%	2.913	0.84-10.11	0.095
No	146	71.6%	22	88.0%	1		

no.= Absolute frequency, % = Relative frequency, OR = Odds Ratio, CI = Confidence interval