



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ- REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Isolamento e identificação de genótipos de *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) comercializadas em mercados populares no estado de Pernambuco, Brasil.

RENATO AMORIM DA SILVA

RECIFE

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Isolamento e identificação de *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) comercializadas em mercados populares no estado de Pernambuco, Brasil.

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota.

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Pimentel
Bandeira de Melo

RENATO AMORIM DA SILVA

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586i Silva, Renato Amorim da
Isolamento e identificação de *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) comercializadas em mercados populares no estado de Pernambuco, Brasil. / Renato Amorim da Silva. - 2024. 62 f. : il.
- Orientador: Rinaldo Amorim da Silva.
Coorientador: Renata Pimentel Bandeira de Melo.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2024.
1. Apicomplexa. 2. bioensaio. 3. genotipagem. 4. saúde-pública. 5. zoonose. I. Silva, Rinaldo Amorim da, orient. II. Melo, Renata Pimentel Bandeira de, coorient. III. Título

CDD 636.089

RENATO AMORIM DA SILVA

Isolamento e identificação de *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) comercializadas em mercados populares no estado de Pernambuco, Brasil.

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área De Concentração: Morfofisiologia, sanidade animal, humana e ambiental.

Dra. THAIS FERREIRA FEITOSA

Examinadora Externa à Instituição

Dr. WAGNER JOSE NASCIMENTO PORTO

Examinador Externo à Instituição

Dr. JOSE WILTON PINHEIRO JUNIOR, UFRPE

Presidente

Dedicatória

Aos meus familiares e amigos, presentes nesse plano ou já adiante no próximo, a vocês dedico esse trabalho.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que recebi durante a vida que permitiram que seguisse o caminho que sonhei. Guardo um sentimento de carinho e gratidão aos meus pais, Valéria e José Amaro, por me apoiarem e estarem presentes nos momentos alegres e difíceis. Agradeço em especial a minha mãe por toda dedicação e apoio durante essa jornada, se há alguém que profundamente acredita em mim, essa pessoa é ela. Não posso deixar de agradecer também ao apoio que me foi dado por Vovó Fátima e minha querida madrinha Maria. Aos amigos Raianne, Andrea e Raul agradeço pelo suporte oferecido durante toda duração de nossa amizade. Que ela seja duradoura e repleta de momentos felizes.

Agradeço também a minha segunda família, o grupo de pesquisa do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LDIC) da UFRPE. Sempre me senti muito bem acolhido desde a iniciação científica até o presente momento e espero ainda poder estar presente com todos na bancada por mais algum tempo. Agradeço a todos os membros do grupo que acompanhei e acompanho até hoje por estarem sempre dispostos a me ensinar algo novo ou a oferecer algum conselho ou piada para alegrar meu dia. Dentro ainda do grupo algumas pessoas em especial marcaram os dois anos de meu mestrado, os assim denominados “Tóxicos”, o pessoal que trabalhou na linha de pesquisa com *Toxoplasma gondii*. Por termos dividido os momentos de choro, felicidade em obter o primeiro isolado de *T. gondii*, estresse e inúmeras outras experiências, sinto que criamos um laço de amizade e companheirismo. Assim agradeço a Dra. Pollyanne por sempre cuidar da gente, em especial por não deixar que ateássemos fogo no laboratório, à Jéssica, eterna parceira de PIBIC e sempre disposta a oferecer ajuda, a Hannah e Maria Luiza, obrigado por sempre estarem presentes e por toda ajuda, sem vocês não seria possível executar esse trabalho. Agradeço também em especial a Raissa, que durante esses dois anos choramos e dividimos alegrias juntos no biotério, entramos em desespero, mas no fim ganhei uma grande amiga e uma excelente parceira de bancada.

Dentre outros nomes especiais gostaria de citar Denny, por ter sido um grande amigo que me foi apresentado pela academia, extremamente inteligente e engraçado, espero que saibas que tenho grande carinho por ti. Agradeço também à Lucilene e Jerlane, grandes amigas que também estiveram sempre dispostas a oferecer uma ajuda ou uma boa risada. À Nazaré, por sempre estar lá para dividir algum conselho ou pensamento positivo. Agradeço aos técnicos Gabi, André e Adriano, por toda paciência que tiveram comigo e por passar os dias arretando o juízo dos coitados. A Sérgio, por sempre estender uma mão quando necessário e por ser um livro aberto com todo conhecimento que guardas. Aos demais membros do grupo Professor Wilton Júnior Taizi, Nataly, Órion, Marcela, Emily, Guilherme, Gustavo, Eduarda, Valdir, Maria Clara,

Rafaela, Alice, Maria Eduarda, Taoana, Débora, e demais membros, agradeço por tornarem a pesquisa mais divertida.

Não posso deixar de agradecer em especial ao meu orientador, Professor Rinaldo Mota, por acreditar em mim e confiar que eu seria capaz de iniciar e concluir esse projeto. Muito mais que um orientador, agradeço, também por estar lá para me oferecer conselhos e soluções para problemas além da academia. Além de orientador espero que saibas que és um exemplo e que guardo muito carinho por ti, obrigado prof. A minha coorientadora, Professora Renata, guardo também um forte sentimento de gratidão. Para sempre conhecida como a Chefa, tenho muito a agradecer por tudo que me ensinastes na bancada, por todos os conselhos e puxões de orelha. Agradeço em particular a ambos pela paciência que tiveram comigo, sei que exercitei um pouco a paciência de vocês. Por fim a Professora Erika, obrigado por todo apoio durante a execução do experimento, por toda animação e energia positiva. Foi graças ao apoio de uma equipe tão forte que me sinto feliz não só pela conclusão do Mestrado, mas também pelo crescimento pessoal. Levarei sempre um pouco de vocês comigo aonde for.

Epígrafe

“Onde se queimam livros, em breve passarão a queimar pessoas.” – Coração de Tinta (Cornelia Funke)

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório de distribuição mundial e capaz de parasitar diversas espécies homeotérmicas, e que apresenta grande importância devido seu potencial zoonótico. Objetivou neste estudo avaliar presença e viabilidade de *T. gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) destinadas ao consumo humano no estado de Pernambuco, Brasil. Foram coletadas amostras de sangue e tecidos de 25 galinhas comercializadas em mercados populares do Recife. Inicialmente utilizou-se a técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. As aves reagentes no ponto de corte 1:16 tiveram seus tecidos (encéfalo e coração) submetidos ao Bioensaio em modelo murino, utilizando camundongos da linhagem *Swiss-Webster*. Os camundongos inoculados foram avaliados por um período de 45 dias, e no trigésimo dia pós-inoculação (d.p.i.) foi coletada amostra de sangue para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* na RIFI. Os animais foram eutanasiados no dia 45 d.p.i. e os reagentes no ponto de corte 1:16 tiveram o encéfalo avaliado para a pesquisa de cistos de *T. gondii* e, posteriormente, inoculação em cultura *in vitro* de células MA-104 (ATCC® CRL-2378.1). Tecidos dos camundongos do bioensaio foram submetidos a PCR para o gene ITS-1 de *T. gondii*. Observou-se frequência de 68,00% (17/25) para anticorpos anti-*T. gondii* nas aves avaliadas e soroconversão de 64,70% (22/34) dos camundongos na bioprova. Foram obtidos sete isolados de *T. gondii*, com a caracterização genética de três isolados e identificação de dois genótipos (ToxoDB #36 e #114). Relata-se a ocorrência de presença e viabilidade de cistos de *T. gondii* em galinhas destinadas ao consumo humano no estado de Pernambuco com possíveis implicações na saúde dos consumidores dos tecidos destas aves. A presença de genótipos atípicos pode ser atribuída à diversidade genética relatada na região, com destaque para a ocorrência do genótipo ToxoDB#36 em galinhas no estado de Pernambuco.

Palavras-chave: Apicomplexa, bioensaio, genotipagem, saúde-pública, zoonose.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite with worldwide distribution and capable of parasitizing several homeothermic species, and which is of great importance due to its zoonotic potential. The aim of this study was to isolate and identify *T. gondii* from tissues of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) raised extensively and intended for human consumption. Blood and tissue samples were collected from 25 chickens destined for slaughter. Initially, the Indirect Immunofluorescence Assay (IFAT) technique was used as screening to detect antibodies anti-*T. gondii*. The positive animals at the cutoff point of 16 had their tissues (brain and heart) subjected to the Bioassay in a murine model, using Swiss-Webster mice. The inoculated mice were evaluated for a 45 days period, and on the thirtieth day post-inoculation, a blood sample was collected from each inoculated mouse to detect antibodies anti-*T. gondii* by IFAT. Animals were euthanized on day 45 p.i. and those positive at the cutoff point of 1:16 had their brains evaluated for *T. gondii* cysts and subsequently inoculated into an in vitro culture of MA-104 (ATCC® CRL-2378.1) cells. Aliquots of mouse tissue and cell culture were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) for confirmation through detection of the ITS-1 gene. A frequency of 68.00% (17/25) of anti-*T. gondii* in the evaluated chickens, which resulted in a seroconversion of 64.70% (22/34) in the inoculated mice. Seven *T. gondii* isolates were obtained with genetic characterization of three isolates revealing two genotypes (ToxoDB#36 and #114). From the results obtained, the presence and viability of *T. gondii* cysts in chickens intended for human consumption is reported. This occurrence reflects the status of environmental contamination, providing data regarding the circulation of a zoonotic agent of severe importance for public health. The presence of atypical genotypes can be attributed to the genetic diversity recorded in this region. We highlight the occurrence of the ToxoDB#36 genotype in chickens in the Pernambuco state.

Keywords: Apicomplexa, bioassay, genotyping, public health, zoonosis.

Sumário

Capítulo I

1. Introdução.....	15
2. Revisão de Literatura	
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	17
2.2 Ciclo biológico e vias de transmissão.....	17
2.3 Diagnóstico da Toxoplasmose e Infecção por <i>T. gondii</i>	22
2.4 Variabilidade genética de <i>T. gondii</i>	24
2.5 <i>Toxoplasma gondii</i> em galinhas.....	26
2.6 Impacto da Toxoplasmose na saúde pública.....	28
3. Objetivos.....	31
4. Referências	32

Capítulo II

1. Artigo I.....	40
2. Considerações Finais.	61

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1	Prevalência de <i>Toxoplasma gondii</i> em galinhas (<i>Gallus domesticus</i>) no Brasil.	27
Tabela 2	Prevalência de <i>Toxoplasma gondii</i> em galinhas (<i>Gallus domesticus</i>) no mundo.	28

Capítulo II

Tabela 1	Soroconversão em modelo murino e diagnóstico molecular de <i>Toxoplasma gondii</i> em material de bioensaio e cultura <i>in vitro</i> a partir da detecção do gene ITS-1.	47
Tabela 2	Caracterização genética por PCR-RFLP de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos de galinhas destinadas ao consumo humano no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.	48

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Ciclo de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
----------	--	----

CAPÍTULO II

Figura 1	Análise filogenética de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> , caracterizados por PCR-RFLP, utilizando como referência linhagens clonais I, II, III, II-variante, BrI, BrII, BrIII, BrIV, Cougar, TgCatBr5, TgCatBr64 e isolados obtidos de galinhas no Brasil.	49
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAT	Modified Agglutination Test (Teste de Aglutinação Modificado)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
IFAT	Indirect Immunofluorescence Assay
ELISA	Ensaio imunoenzimático
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição)
pb	(pares de base)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
pMol	Picomol

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Grau Celsius

μl Microlitro

% Porcentagem

1. Introdução

O Brasil possui grande potencial para a produção de alimentos, seja de origem animal ou vegetal. Em 2020 foram abatidos 29,7 milhões de bovinos, 6,0 bilhões de frangos, 49,3 milhões de suínos, assim como 3,96 bilhões de dúzias de ovos de galinha, e comercializados mais de 25,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2021). Apesar da situação favorável de mercado e do número significativo de produtores inseridos nessa atividade, diversos problemas existentes nas unidades de produção ainda constituem fatores limitantes para o aumento da produtividade e oferta de produtos (carne, leite e derivados) com a qualidade e a regularidade na oferta exigida pelos consumidores. Dentre os entraves nos sistemas produtivos, os problemas sanitários se constituem em uma das principais causas do baixo desempenho zootécnico e econômico dos rebanhos (Maciel, 2006).

Toxoplasma gondii é um protozoário de distribuição mundial, especulando-se que ampla parte da população humana esteja infectada (Tenter et al., 2000). O protozoário foi identificado primeiramente por Nicolle e Manceaux em 1909 em um roedor (*Ctenodactylus gondii*) na Tunísia, e, no mesmo ano por Splendore em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*), no Brasil (Ferguson, 2009; Fialho et al., 2009). Trata-se de um coccídeo intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa e família Sarcosistidae que acomete principalmente o tecido nervoso, muscular esquelético, muscular cardíaco e placentário (Dubey et al., 2012).

Trata-se de um parasito heteroxênico capaz de utilizar qualquer espécie animal homeotérmica como hospedeiro. Seu hospedeiro definitivo são os felídeos, nos quais o parasito é capaz de realizar a fase sexuada de seu ciclo e liberação dos oocistos não esporulados no ambiente. As demais espécies animais atuam como hospedeiros intermediários, onde *T. gondii* realiza apenas a fase assexuada do seu ciclo (Ferguson, 2009).

Em humanos, a via de transmissão oral destaca-se como a principal, estando relacionada principalmente com a ingestão de alimentos contaminados com cistos contendo os bradizoítos e oocistos, ou ingestão de água contaminada por oocistos esporulados (Dubey, 2004; Fialho et al., 2009). Indivíduos

imunocompetentes costumam ter uma primo-infecção assintomática, devido à conversão dos taquizoítos em bradizoítos em resposta ao estímulo imunológico do hospedeiro. Em casos sintomáticos, os humanos podem apresentar uma síndrome infecciosa não específica acompanhada de febre alta e prolongada, linfadenomegalia, esplenomegalia, problemas pulmonares, hepatomegalia (Demar et al., 2011) e, em alguns casos, anormalidades oftalmológicas como a retinocoroidite (Gilbert et al., 2008).

Estudos sobre a estrutura populacional de *T. gondii* têm sido realizados para elucidar a contribuição da variedade genética sobre características epidemiológicas como transmissão do agente e manifestação de sinais clínicos (Ajzenberg et al., 2004; Lehmann et al., 2004; Lehmann et al., 2006). Estes estudos determinaram que isolados de *T. gondii* de humanos e animais na América do Norte e Europa apresentam baixa diversidade genética e estrutura populacional predominantemente clonal (Dubey, Beattie, 1988; Howe, Sibley, 1995). Porém, estudos posteriores realizados na América do Sul, principalmente no Brasil, observaram uma alta diversidade genética de *T. gondii*, com predominância de genótipos não clonais (recombinantes ou atípicos) identificados em humanos e animais. Essa característica decorre da recombinação sexual do parasito, favorecida pela grande biodiversidade presente nestas regiões (Ajzenberg et al., 2004; Su et al., 2006; Pena et al., 2008).

O desequilíbrio nos biomas na região nordeste do Brasil pode culminar no aparecimento de isolados de *Toxoplasma gondii* mais virulentos, sendo esse um risco para a população humana e animal. Estudos voltados para o isolamento de *T. gondii* e posterior identificação genética dos isolados são de grande valor para implementação de um plano de vigilância sanitária, uma vez que auxilia na identificação de uma possível fonte de infecção para a população animal e humana.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório membro do subfilo Apicomplexa, classificação que divide com outros parasitos de reconhecida importância como *Neospora caninum*, *Besnoitia besnoiti* e *Sarcocystis neurona*. Está inserido na classe Conoidasida, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae e sub-família Toxoplasmatinae. É um parasito formador de cistos teciduais capaz de utilizar diversas espécies animais homeotérmicas como hospedeiros intermediários, incluindo a espécie humana. Apenas os felídeos são capazes de realizar a fase sexuada do ciclo de *T. gondii* que culmina na eliminação de oocistos nas fezes (Adl, 2012; Ruggiero et al., 2015).

A espécie foi primeiramente relatada por Nicolle e Manceux no ano de 1909 no instituto Pasteur na Tunísia. O parasito foi encontrado em infecção disseminada e fatal em roedores denominados gundi (*Ctenodactylus gundii*) (Nicolle; Manceaux, 2009). Splendore, no Brasil, também identificou um parasito semelhante causando infecção em coelhos no estado de São Paulo no ano de 1909 (Splendore, 2009). O parasito foi identificado infectando diversos órgãos, incluindo o baço, pulmões, rins, fígado e linfonodos mesentéricos, sendo inicialmente relatado como uma nova espécie de "*Leishmania*". Posteriormente, o parasito foi realocado em um novo gênero "*Toxoplasma*" devido a sua forma semelhante a um arco ou "meia lua" (do grego: *toxon* = arco; *plasma* = forma), recebendo também o epíteto "*gondii*" em referência ao roedor do qual foi inicialmente isolado por Nicolle & Manceaux.

2.2 Ciclo Biológico e Vias de Transmissão

T. gondii é um parasito eurixeno capaz de utilizar as mais diversas espécies animais como hospedeiros em seu ciclo de vida. É capaz de infectar

animais vertebrados domésticos e silvestres, incluindo a espécie humana, havendo relatos na literatura de infecção em aves até os cetáceos. Seu ciclo é caracterizado como o de um parasito heteroxênico, onde apenas os membros da família *Felidae* são capazes de atuar como hospedeiros definitivos. Desta forma, os felídeos domésticos e silvestres participam de um ponto vital na manutenção do parasito no ambiente, visto que são os únicos capazes de liberar os oocistos no ambiente (Dubey, 1998).

No ciclo de vida, destacam-se três formas infectantes do parasito: o oocisto esporulado, o taquizoíta e o bradizoíta. Essas diferentes formas poderão ser observadas à medida que *T. gondii* altera sua conformação e metabolismo para se adaptar ao ambiente oferecido pelo hospedeiro (Dubey et al., 1998). A principal via de infecção para os hospedeiros definitivos e intermediários é via oral, a partir do consumo de água ou alimentos contaminados (Dubey et al., 2012). Em casos de infecção aguda ou ativa durante a gestação há a possibilidade de infecção vertical através da passagem dos taquizoítos pela via transplacentária (Va et al., 2006).

Na fase assexuada, os taquizoítos e bradizoítos aparecem como principais atores no ciclo. O taquizoíta é caracterizado por sua forma semelhante a um arco ou “meia lua” medindo por volta de 2 x 6 micrômetros. Possuem uma extremidade com aspecto “pontagudo” na qual se encontra seu aparato metabólico para invasão celular. Pode adentrar as células tanto por estímulo a fagocitose como pode forçar a membrana plasmática da célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo, e dentro deste, o parasito consegue evadir os mecanismos do sistema imune do hospedeiro e iniciar sua multiplicação (Nichols et al., 1983; Bonhome et al., 1992).

O taquizoíta se multiplica por endodiogenia, um processo de divisão celular no qual uma célula primária dá origem a dois clones idênticos. Conforme sugerido pelo prefixo no nome da forma evolutiva em questão (Tachos, do grego = rápido), essa divisão ocorre de forma veloz, culminando na ruptura da célula hospedeira (Gilbert et al., 2008; Machado et al., 2014). Esse processo causa a morte das células parasitadas por ruptura da membrana plasmática, iniciando um processo de necrose tecidual. Durante esta fase do parasitismo, *T. gondii* apresenta tropismo por determinados tipos celulares como trofoblastos,

hepatócitos, células do tecido nervoso e do tecido muscular estriado cardíaco e esquelético. Seu tropismo por trofoblastos é responsável pela manifestação clínica de caráter reprodutivo (Vaz et al., 2006).

Com a progressão da interação parasito-hospedeiro, o processo infeccioso estimula a eventual produção de uma resposta imune específica contra o agente. Uma vez que o hospedeiro passa a montar uma resposta imunológica competente e específica, o protozoário passa por um processo de alteração em seu metabolismo e se reproduz como forma de escape da resposta imune (Vaz et al., 2008).

O resultado da evasão do sistema imune é a formação da segunda forma evolutiva da reprodução assexuada do parasito, o bradizoíto. Essa conformação é observada no interior de cistos teciduais intracelulares onde o parasito se reproduz lentamente por um processo conhecido por endopoligenia, isto é, ocorre a geração de múltiplos clones, ao mesmo tempo, porém em um ritmo desacelerado. O tamanho do cisto tecidual é diretamente proporcional a sua idade, podendo abrigar de 2 até centenas de bradizoítos a depender do quão antigo é o cisto (Dubey et al., 2010). Os cistos são a forma de latência do parasito, podendo permanecer viáveis, sem provocar respostas do sistema imune, por anos (Dubey et al., 1998).

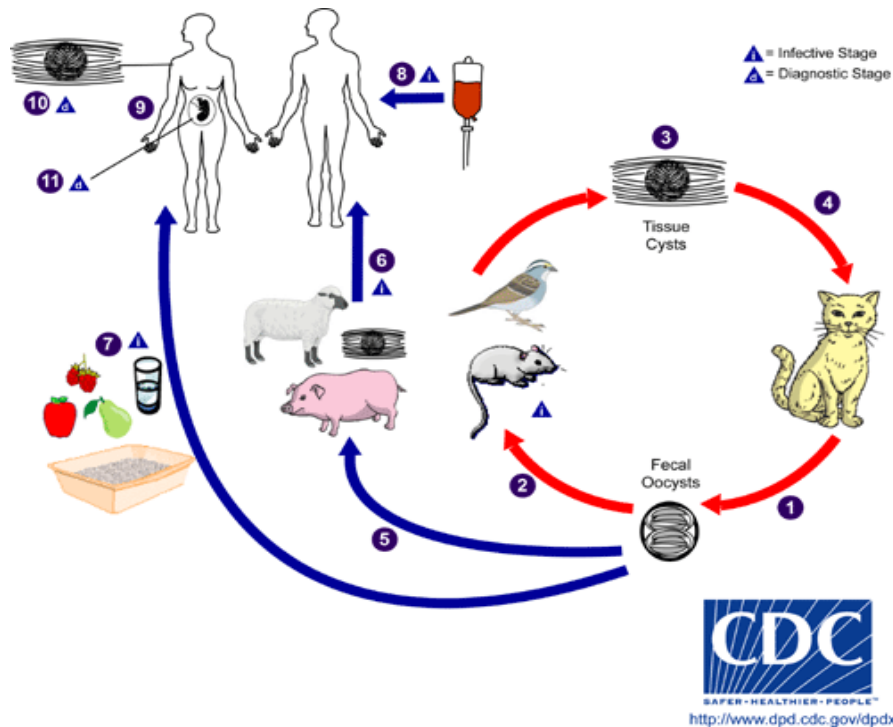
Os órgãos de predileção para multiplicação do parasito incluem o encéfalo, olhos (particularmente a retina), fígado, músculo estriado esquelético e cardíaco, baço, rins além da placenta e anexos fetais, em indivíduos gestantes. Sua distribuição nestes tecidos pode variar de acordo com o isolado de *T. gondii* ou mesmo com a espécie animal infectada (Dubey, 1997). Em galinhas, (*Gallus domesticus*) observa-se mais frequentemente o encistamento do parasito no tecido encefálico, olhos e musculatura cardíaca; em camundongos (*Mus musculus*) observa-se maior frequência de cistos em encéfalo (Dubey, 1997; Dubey, 2008). Esta estrutura representa também uma das principais formas infectantes para o hospedeiro definitivo e hospedeiros intermediários, por meio do consumo da carne contaminada por cistos contendo os bradizoítos (Dubey, 2004).

Diferente de ambas as formas de reprodução assexuada anteriormente descritas, a reprodução sexuada ocorre apenas no epitélio intestinal dos felídeos, hospedeiros definitivos de *T. gondii*. O felídeo se infecta por meio da via oral pela ingestão de carne contaminada por cistos durante a caça/predação, ou pela ingestão de oocistos esporulados em água contaminada (Dubey, 2004; Dubey, 2010).

Em contato com o aparato enzimático presente no trato gastroentérico do hospedeiro, a parede do cisto, contendo os bradizoítos, ou os oocistos contendo esporozoítos, é degradada liberando o parasito no lúmen intestinal. A partir daí, este pode se converter em taquizoíto, iniciar um processo de parasitemia e reprodução assexuada ou iniciar o processo de merogonia ao adentrar nas células do epitélio intestinal. Ao fim do processo de merogonia e gametogonia será formado o oocisto na forma não infectante ou não esporulado. Esse processo leva à ruptura das células epiteliais do intestino, podendo culminar em um processo de irritação da mucosa intestinal. Os oocistos são liberados junto com as fezes no ambiente e sob condições ideais de oxigenação, umidade e temperatura podem se tornar infectantes ao passar pelo processo de esporulação. Esse processo pode durar de 1 a 5 dias e ao final, o oocisto desenvolverá dois esporocistos que albergam quatro esporozoítos cada (Dubey, 2004).

Durante o ciclo biológico, *T. gondii* pode ser transmitido para novos hospedeiros pelas vias horizontal e vertical. A transmissão horizontal é epidemiologicamente mais importante, sendo responsável pela distribuição do parasito no ambiente. A transmissão ocorre majoritariamente pela via alimentar através da ingestão de carne crua ou malcozida contaminada com cistos contendo bradizoítos (Dubey et al., 2012). A figura 1 demonstra um esquema das vias de transmissão de *T. gondii* entre seus hospedeiros.

Figura 1: Ciclo de transmissão de *Toxoplasma gondii*



Fonte: CDC, 2015

A ingestão de vegetais e legumes ou água contaminados por oocistos esporulados também é uma importante forma de disseminação do parasito. É importante salientar que os felídeos são responsáveis pela eliminação de oocistos no ambiente, mesmo que apenas em determinado momento de sua vida, e estes poderão ser dispersados por intempéries do ambiente como vento e chuvas (Cook et al., 2000).

Outra forma de transmissão de *T. gondii* é a vertical, que usualmente ocorre durante a fase de parasitemia, ou seja, na primo-infecção ou fase aguda do processo infeccioso em gestantes. Nesse processo, os taquizoítos invadem os trofoblastos do tecido placentário, causando uma placentite necrosante, podendo atravessar a barreira placentária e infectar o feto. Em diversas espécies animais como ovinos, caprinos e humanos, esse processo pode culminar em severas consequências reprodutivas, desde o aborto espontâneo, má formação fetal ou problemas oftálmicos e neurológicos do feto infectado. A liberação de produtos de aborto, quando ocorre, funciona também como forma de

manutenção do parasito no ambiente, em especial em propriedades onde há a convivência de diversas espécies animais (Vaz et al., 2006; Dubey et al., 2012).

2.3 Diagnóstico da Toxoplasmose e Infecção por *Toxoplasma gondii*.

O diagnóstico da toxoplasmose envolve a união de achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Uma vez que a infecção por *T. gondii* possui sinais e manifestações inespecíficas, os achados laboratoriais tomam um importante papel na obtenção de um diagnóstico eficaz (Dubey et al., 2020). Várias técnicas podem ser aplicadas ao diagnóstico deste parasito, desde técnicas sorológicas indiretas como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste de Aglutinação Modificada (MAT), até técnicas de diagnóstico direto como a histopatologia, biologia molecular e o isolamento do parasito (Camargo, 1964; Dubey, 2010; Su et al., 2010).

As técnicas indiretas se fundamentam na detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, buscando as classes IgM e IgG. É vital salientar que, apesar de sua aplicabilidade no diagnóstico da toxoplasmose, a detecção de anticorpos, mesmo que em altos títulos, não necessariamente acusa um processo infeccioso grave ou ativo (Goldsmith, 1998; Dubey et al., 2020). Títulos de anticorpos podem permanecer detectáveis por meses ou anos, a exemplo da IgM que apesar de associada a processos infecciosos recentes ou agudos pode permanecer detectável na corrente sanguínea por até 18 meses (Cantos et al., 2000; Figueiró-Filho et al., 2005).

A detecção direta do parasito pode ser realizada a partir de alguns tecidos do hospedeiro. A pesquisa de cistos teciduais pode, por exemplo, ser realizada a partir do *imprinting* de tecido encefálico ou, ainda, podem ser observados taquizoítos em fluído cerebrospinal durante a fase aguda da doença (Dubey & Beattie, 1988). Em felídeos, o diagnóstico coproparasitológico pode ser aplicado para detecção de oocistos, entretanto, por vezes, não é possível diferenciar o oocisto de *T. gondii* do oocisto de outros coccídios como *Hammondia hammondi*.

Os oocistos podem ainda ser detectados em solo, uma vez que são liberados no ambiente, entretanto apresentam a mesma limitação que a detecção de oocistos em exames coproparasitológicos (Dubey et al., 2020).

O isolamento de *T. gondii* pode ser aplicado no diagnóstico da presença e viabilidade do parasito em amostras teciduais (Dubey, 1988). O bioensaio em modelo murino é uma das técnicas mais utilizadas para o isolamento de *T. gondii*, permitindo a observação da presença, viabilidade e avaliação da virulência de cepas de *T. gondii*. Através de um processo de digestão que mimetiza a passagem do cisto ou oocisto pelo trato gastrointestinal de um hospedeiro, é possível realizar a ruptura dessas estruturas, liberando a forma infectante do parasito (Dubey, 2010; Saraf et al. 2017). O isolamento *in vitro* também é uma opção a ser considerada. Essa modalidade de isolamento necessita de uma cultura de células suscetíveis ao parasitismo. Apesar de possuir um custo bastante elevado, em especial quando comparado ao modelo murino, o cultivo celular permite a obtenção e conservação de isolados em culturas puras, particularmente útil quando se propõe a realização de estudos de genotipagem (Chatterton et al., 2002).

Uma limitação quanto ao isolamento é o tempo de viabilidade da amostra. Uma vez que o isolamento tem como objetivo a detecção de viabilidade do parasito, a sua perda pode culminar em resultados negativos em tentativas de isolamento. A perda de viabilidade ocorre naturalmente em caso de morte do hospedeiro e, em casos de congelamento da amostra. Desta forma, sugere-se que amostras destinadas ao isolamento de *T. gondii* sejam processadas em até 72h *post mortem* (Dubey, 1998).

O emprego da biologia molecular, em particular a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é de grande auxílio no diagnóstico da toxoplasmose. Graças aos diversos protocolos estabelecidos atualmente estão disponíveis um arsenal de marcadores genéticos que permitem a detecção do parasito mesmo que em baixa concentração. Com o uso da PCR aplicado ao diagnóstico de *T. gondii* é possível detectar o parasito em diversas secreções e tecidos sem a interferência da “janela imunológica”, uma das maiores limitações na aplicação do diagnóstico sorológico (Dubey, 2010; Su et al., 2010).

Dentre os genes selecionados como marcadores para a detecção do parasito se destacam os genes 529 e o ITS-1. O gene 529 possui grande repetição no genoma de *T. gondii*, permitindo que possa ser detectado mesmo em casos de baixa carga parasitária na amostra, sendo relatado até um mínimo de 4 taquizoítos como seu limiar de detecção (Homan et al., 2000). O gene ITS-1 não apresenta a mesma vantagem de detecção observada no gene 529, entretanto a padronização de um protocolo Nested-PCR (Hurtado et al., 2001) permitiu uma boa sensibilidade para detecção do parasito, visto que a dupla amplificação compensa uma menor quantidade de DNA alvo.

Outros protocolos não tão específicos como aqueles direcionados para a detecção de espécie, podem também ser aplicados como forma de triagem amostral, desde que acompanhados de outro protocolo molecular capaz de confirmar a espécie do parasito. O gene 18S do DNA ribossomal dos parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa pode ser utilizado como uma forma de triagem, visto que a sensibilidade desta técnica é superior àquela observada em outros genes espécie-específicos. Algo útil quando se trata de amostras de tecido em que a carga parasitária pode não ser suficiente para detecção pelos genes ITS-1 e 529 (Su et al., 2010).

Outra vantagem da aplicação da PCR ao diagnóstico de *T. gondii* é a capacidade de detecção do parasito em amostras não mais viáveis ao isolamento, como no caso de tecidos e fluidos que passaram por um processo de congelamento, por exemplo (Dubey et al., 2020). Uma quantidade mínima de material biológico utilizado é algo que pode ser discutido do ponto de vista favorável ou desfavorável, uma vez que uma menor quantidade de tecido analisada poderia implicar em redução nas chances de obtenção de DNA parasitário. Apesar de pouco tecido ou fluido ser necessário em protocolos de extração/PCR, a distribuição do parasito pelos órgãos do hospedeiro pode se mostrar um fator limitante ao diagnóstico, apesar dos conhecidos “tecidos de eleição” (Schaes et al., 2018; Dubey et al., 2020).

2.4 Variabilidade genética de *T. gondii*

Numerosos estudos sobre a estrutura populacional de *T. gondii* têm sido realizados para elucidar a contribuição de sua variedade genética sobre características epidemiológicas, como transmissão do agente e manifestação de sinais clínicos (Ajzenberg et al., 2004; Lehmann et al., 2004; Lehmann et al., 2006). Estudos determinaram que isolados de *T. gondii* de humanos e animais na América do Norte e Europa apresentaram baixa diversidade genética e estrutura populacional predominantemente clonal (Dubey, Beattie, 1988; Howe, Sibley, 1995).

Inicialmente, *T. gondii* foi classificado em três linhagens genéticas clonais (I, II, III), relacionando-as ao comportamento de virulência em camundongos e, sendo o tipo I considerado letal para camundongos, independente da dose, enquanto os tipos II e III são geralmente de baixa virulência ou não virulentos (Howe, Sibley, 1995; Su et al., 2010; Dubey et al., 2010). As linhagens foram estabelecidas através do uso da técnica de polimorfismo de fragmentos de DNA produzidos por restrição enzimática em produtos amplificados pela reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR) (Howe & Sibley, 1995). Porém, estudos posteriores na América do Sul, principalmente no Brasil, observaram uma alta diversidade genética de *T. gondii*, com predominância de genótipos não clonais (recombinantes ou atípicos) identificados em humanos e animais (Pena, 2008; Vitaliano et al.; 2014). Esta característica decorre da recombinação sexual do parasito, favorecida pela grande biodiversidade presente nestas regiões (Ajzenberg et al., 2004; Su et al., 2006; Pena et al., 2008).

Estudos realizados no Brasil tentaram padronizar uma classificação de linhagens brasileiras através de um banco de dados de 48 genótipos obtidos a partir de 125 isolados. Foi relatada maior repetição de 04 genótipos, nomeados BrI, BrII, BrIII e BrIV, e estes seriam considerados as linhagens clonais no Brasil assim como as linhagens I, II e III seriam para a América do Norte e Europa (Pena et al., 2008). Entretanto, conforme previamente citado, a grande biodiversidade e favorecida recombinação sexual dos biomas brasileiros dificulta a prevalência das então citadas como linhagens clonais brasileiras, sendo assim atualmente é considerado que não há predominância de linhagens clonais ou genótipos no Brasil (Saraf et al., 2017; Dubey et al., 2020).

2.5 *Toxoplasma gondii* em galinhas

Em relação aos estudos desenvolvidos em aves, os mais frequentes utilizam a espécie *Gallus domesticus* (Dubey et al., 2010). Esta espécie geralmente não apresenta sinais clínicos, mas oferece risco de transmissão quando há o consumo de sua carne crua ou parcialmente cozida (Ruiz & Frekel, 1980). Além disso, as galinhas são utilizadas como um indicador indireto de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*, uma vez que são amplamente expostas a este protozoário quando exercem o hábito de ciscar o chão (Dubey et al., 2015; Magalhães et al.; 2016).

Sua importância quanto ao indicador de contaminação ambiental é de relevante significância para avaliar o status ambiental frente à contaminação por oocistos de *T. gondii*. Em regiões com elevadas taxas de prevalência de infecção por *T. gondii* em galinhas, espelham também um elevado risco de infecção para a população humana local (Dubey et al., 2015). O risco se dá não pelo consumo da carne dessas aves, uma vez que o preparo para consumo costuma ser suficiente para inativar o parasito, mas sim por ser um indicativo de uma alta carga parasitária presente no ambiente, em especial solo e fontes de água (Cook et al., 2000). O hábito de ciscar permite que as galinhas mantenham uma constante relação de contato com o solo, permitindo que o animal atue como um espelho referente ao solo, refletindo no status sanitário para a contaminação por *T. gondii*. Isso é observado em especial em galinhas selvagens (*Gallus gallus*) e galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) de criação extensiva. Esta relação não é observada em aves de criação industrial com a mesma frequência (Abbaszadeh et al., 2022).

A discrepância observada na prevalência do parasito entre populações de criação extensiva e intensiva não decorrem de divergências fisiológicas, mas sim pelas diferentes formas de manejo às quais são submetidas. Nas galinhas de criações comerciais, o eficiente controle de qualidade de água, alimento, e a falta de contato com o solo dificultam o acesso de *T. gondii* ao hospedeiro. Além

disso, em granjas de criação intensiva há intenso controle de circulação de animais, portanto, os felídeos não conseguem acessar o espaço onde se localizam as aves para causar a contaminação do ambiente com oocistos (Shokri et al., 2017). Por outro lado, a criação extensiva de galinhas é uma atividade particularmente barata e por isso é amplamente praticada ao redor do mundo. Entretanto, o baixo nível de tecnificação nesse tipo de prática agropecuária traz como consequência a exposição dos animais às intempéries do ambiente e a agentes infecciosos (Schares et al., 2017). Porém, o baixo custo de criação destas aves é atrativo e estimulante, particularmente entre a população com menos recursos (Cook et al., 2000). Na Tabela 1 se observa a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* relatada em estudos realizados em populações de galinhas no Brasil.

Tabela 1: Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) no Brasil.

Estado/Região	Método diagnóstico	Prevalência	Referência
Nordeste			
Alagoas	RIFI	36,00%	Silva et al. (2020)
Bahia	RIFI	25,00%	Gonçalves et al. (2012)
Paraíba	RIFI	31,50%	Feitosa et al. (2016)
Pernambuco (FN)*	RIFI	88,40%	Magalhães et al. (2016)
Pernambuco (FN)*	RIFI	80,00%	Costa et al. (2012)
Pernambuco (FN)*	MAT	84,00%	Dubey et al. (2010)
Pernambuco	RIFI	40,50%	Fernandes et al. (2016)
Pernambuco	RIFI	27,90%	Sá et al. (2017)
Sudeste			
Rio de Janeiro	RIFI	21,60%	Casartelli-Alves et al. (2012)
Minas Gerais	RIFI	53,60%	Brandão et al. (2006)
Espírito Santo	RIFI	38,80%	Beltrame et al. (2012)
Sul			
Santa Catarina	MAT	51,50%	Pena et al. (2018)

(FN)*Estudo realizado na Ilha de Fernando de Noronha - PE. RIFI: Reação de imunofluorescência indireta. MAT: Teste de Aglutinação Modificada. IHA: Teste de Hemaglutinação Indireta. ELISA: Ensaio Imunoenzimático.

Apesar de raramente demonstrarem sinais clínicos em decorrência da infecção por *T. gondii*, as galinhas são hospedeiros eficientes do parasito. Sua competência como hospedeiro é mais aparente ao comparar a carga parasitária para desenvolver nos tecidos dessas aves, apresentando um importante papel na manutenção do parasito no ambiente. A distribuição dos cistos teciduais é variável a depender da espécie animal parasitada (More et al., 2012; Dubey, 2020), mas em galinhas o coração e o encéfalo são relatados como tecidos de eleição para o diagnóstico molecular e isolamento de *T. gondii* por desenvolverem maior carga parasitária (Dubey et al., 2015).

Tabela 2: Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) no mundo.

País	Método diagnóstico	Prevalência	Referência
Europa			
Alemanha	ELISA	46,70%	Schares et al. (2017)
Américas			
Argentina	RIFI	53,00%	Moré et al. (2012)
México	MAT	25,50%	Alvarado-Esquivel et al. (2012)
Asia			
China	MAT	10,20%	Cong et al. (2012)
China	ELISA	67,10%	Liu et al. (2017)
Tchéquia	RIFI	0,40%	Bartova et al. (2009)
Paquistão	IHA	20,70%	Mahmood et al. (2014)
Tailândia	MAT	10,10%	Shaichua et al. (2017)
Thailândia	RIFI	64,00%	Chumpolbanchorn et al. (2009)

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta. MAT: Teste de Aglutinação Modificada. IHA: Teste de Hemaglutinação Indireta. ELISA: Ensaio Imunoenzimático.

Em raros casos pode haver manifestações clínicas da toxoplasmose nas galinhas. Vielmo et al. (2019) relataram a ocorrência de um surto de toxoplasmose em uma granja no Brasil, onde as aves apresentaram padrões de inflamação e necrose em fígado, rins, sacos aéreos, intestino e miocárdio. Não foi possível observar a presença de cistos teciduais ou taquizoítos e o

diagnóstico foi comprovado por detecção do material genético do parasito no tecido dessas aves.

2.6 Impacto da Toxoplasmose na Saúde Pública

Toxoplasma gondii é um parasito de distribuição cosmopolita, porém a sua prevalência na população é variável. A influência de fatores climáticos como temperatura, umidade, grau de sanidade local e fatores culturais possuem bastante peso sobre a dinâmica do parasito em determinada região (Dubey et al., 2020).

Em humanos, a principal via de infecção é a oral, relacionada principalmente à ingestão de alimentos contaminados com cistos ou oocistos, ou pela ingestão de água contaminada por oocistos esporulados (Dubey, 2004; Fialho et al., 2009). Ambientes insalubres e hábitos alimentares como o consumo de carne crua ou mal cozida aparecem como fatores de risco para a população (Dubey, 2008). Indivíduos imunocompetentes costumam ter uma primo-infecção assintomática, devido à conversão dos taquizoítos em bradizoítos em resposta ao estímulo imunológico. Em casos sintomáticos, os indivíduos podem apresentar uma síndrome infecciosa não específica acompanhada de febre alta e prolongada, linfadenomegalia, esplenomegalia, problemas pulmonares, hepatomegalia (Demar et al., 2011; Machado, 2014) e, em alguns casos, anormalidades olfálticas como a retinocoroidite (Gilbert et al., 2008). A forma de latência do parasito é uma das que apresenta maior potencial de infecção para a espécie humana, visto que a ingestão de carne crua ou mal passada de animais infectados como, por exemplo, as espécies domésticas destinadas à produção animal (Cook et al., 2000). Outra importante forma de infecção para a população humana é a ingestão de água contaminada por oocistos esporulados (Dubey, 2010).

O contato direto com o solo, seja durante a realização de atividades agrícolas, jardinagem, ou mesmo atividades ao ar livre em parques e praças também configura risco para infecção por *T. gondii* (Santos et al., 2010). Oliveira

et al. (2021) ressaltam a presença de oocistos em solo de diversos ambientes públicos na região metropolitana de Recife - PE, dentre os quais podemos destacar hospitais, praças e parques. Em condições ótimas de calor e umidade nos solos os oocistos do parasito podem se manter viáveis por longos períodos de tempo, sendo assim, o contato constante com o solo sem medidas adequadas de proteção favorece a infecção pelo parasito, em especial em crianças com acesso a parques e praças, jardineiros e trabalhadores agrícolas (Cook et al., 2000).

Considerando os riscos, as medidas de controle são de vital importância na prevenção dessa zoonose. Medidas educativas e a difusão de conhecimento referentes às práticas de higiene no preparo de alimentos são medidas eficazes na prevenção da toxoplasmose humana (Cook et al., 2000; Dubey et al., 2012). O controle sanitário de fontes de água e consumo de água tratada são também de grande importância para o controle da toxoplasmose, visto que, a ingestão de água contaminada foi a causa de grandes surtos de toxoplasmose, incluindo o surto ocorrido em Santa Isabel do Ivaí (Paraná) e em Santa Maria (Rio Grande do Sul), este último considerado o maior surto mundial de toxoplasmose (Almeida et al., 2011; Silva et al., 2018). Outras medidas a serem aplicadas incluem o uso de equipamentos de proteção adequados durante atividades associadas ao solo, como jardinagem (Cook et al., 2000).

Um aspecto da Toxoplasmose que é de interesse para a Saúde Pública é a toxoplasmose congênita. O risco para a gestação é relacionado ao trimestre em que a infecção ocorre, onde a repercussão pode variar desde o aborto e má formação congênita até o nascimento de indivíduos cronicamente infectados. A título de prevenção da Toxoplasmose congênita, tem-se a triagem sorológica para anticorpos anti-*T. gondii* durante o pré-natal. A primo-infecção é considerada como o momento de maior risco para complicações ao feto, portanto, mulheres soronegativas representam o grupo em que há maior risco da ocorrência da toxoplasmose congênita. Segundo o manual técnico existente no Brasil, recomenda-se a pesquisa de IgM e IgG anti-*T. gondii* em mulheres gestantes durante a consulta inicial e periodicamente durante a gestação, além de um acompanhamento a fim de prevenir a infecção e suas consequências reprodutivas (Brasil, 2005).

3. Objetivos

3.1 Geral

- Realizar um estudo da presença e viabilidade de *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) destinadas ao consumo humano e comercializadas em Pernambuco, Brasil.

3.2 Específicos

- Detectar anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro de galinhas adquiridas de produtores familiares em mercado público.
- Isolar e identificar *T. gondii* em tecidos de galinhas adquiridas em mercado público por meio de Bioensaio em camundongos.
- Caracterizar genotipicamente os isolados de *T. gondii* por meio da RFLP-PCR.

5. Referências

Abbaszadeh S, Teimouri A, Mahmoudi MR, et al. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in chicken hearts from markets and retail stores in Northern Iran. **Food Waterborne Parasitology**. 2022;27:e00166. Published 2022 Jun 3. doi:10.1016/j.fawpar.2022.e00166

Almeida, Marcio & Oliveira, Luzia & Freire, Roberta & Navarro, Itamar. (2011). Socio-political aspects of toxoplasmosis epidemic in Santa Isabel do Ivaí, Paraná State, Brazil. **Ciência & saúde coletiva**. 16 Suppl 1. 1363-73. 10.1590/S1413-81232011000700071.

Alvarado-Esquivel C, González-Salazar AM, Alvarado-Esquivel D, Ontiveros-Vázquez F, Vitela-Corrales J, Villena I and Dubey JP (2012) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in Durango State, Mexico. **Journal of Parasitology** 98, 431–432.

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. 2012 Sep;59(5):429-93. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x. Erratum in: *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2013 May-Jun;60(3):321. Shadwick, Lora [corrected to Shadwick, Laura]. PMID: 23020233; PMCID: PMC3483872.

Ajzenberg, D.; Banuls, A.L.; SU, C.; Dumetre, A.; Demar, M.; Carme, B.; Dardé, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p. 1185-1196, 2004.

Bártová E, Sedlák K and Literák I. Serologic survey for toxoplasmosis in domestic birds from the Czech Republic. **Avian Pathology** 38, 317–320, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Pré-natal e Puerpério: Atenção qualificada e humanizada, Manual técnico. Brasília-DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Normas e Manuais Técnicos. Série A. Caderno nº5, p.163, 2005.

Camargo, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 6, 117-118. 1964.

Chatterton, J.M.W.; Evans, R.; Ashburn, D.; Joss, A.W.L.; Ho-Yen, J.O. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 51331–335, 2002. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00101-X)

Cong W, Huang SY, Zhou DH, Xu MJ, Wu SM, Yan C, Zhao Q, Song HQ and Zhu XQ. First report of *Toxoplasma gondii* infection in market-sold adult chickens, ducks and pigeons in northwest China. **Parasites and Vectors** vol. 5, 110, 2012.

Chumpolbanchorn K, Anankeatikul P, Ratanasak W, Wiengcharoen J, Thompson RCA and Sukthana Y. Prevalence of *Toxoplasma gondii* indirect fluorescent antibodies in naturally- and experimentally-infected chickens (*Gallus domesticus*) in Thailand. **Acta Parasitologica** vol. 54, 194–196, 2009.

Cook A.J., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenum P.A., Foulon W., Semprini A.E., Dunn D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European research network on congenital toxoplasmosis. *BMJ*. 2000; 321:142–147

Costa, D.G.C; Marvulo, M.F.FV.; Silva, J.S.A.; Santana, S.C.; Magalhães, F.R.J.; Lima Filho, C.D.F.; Ribeiro, V.O.; Alves, L.V.; Mota, R.A.; Dubey, J.P;

Silva, J.C.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Domestic and Wild Animals from the Fernando de Noronha, **Brazilian Journal of Parasitology**, v. 98(3), 2012, pp. 679–680 2012.

Dubey, J.P.; Lago, E.G.; Gennari, S.M.; Su, C.; Jones, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology† **Parasitology** pp. 1375–1424, 2012.

Dubey, J.P. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. August, 2008.

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

Dubey, J.P. & Lehmann, T & Lautner, F & Kwok, Oliver & Gamble, Ray. (2015). Toxoplasmosis in sentinel chickens (*Gallus domesticus*) in New England farms: Seroconversion, distribution of tissue cysts in brain, heart, and skeletal muscle by bioassay in mice and cats. **Veterinary parasitology**. 214. 10.1016/j.vetpar.2015.09.004.

Dubey, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 39, p. 877–882, 2009.

Dubey J.P. 2nd ed. CRC Press LLC; Boca Raton, FL: Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2010.

Dubey, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. v. 126, p. 57–72, 2004.

Dubey, J.P.; Beattie, C.P. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, 220 pp, 1988.

Dubey J.P., Pena H., Cerqueira-Cézar C.K., Murata F., Kwok O., Yang Y.R., Gennari S.M., Su C. Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): the past decade. **Parasitology**. 2020;147(12):1263–1289. doi: 10.1017/S0031182020001134.

Demar, M.; Hommel, D.; Peneau, C.; Boukhari, D. Louvel; Bourbigot, A.M.; Nasser, V.; Ajzenberg, D.; Darde, M.L.; Carme, B. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. **Clinical Microbiology and Infection** 2011.

Ferguson, D.J.P.: *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.104(2), p.133-48, 2009.

Fernandes, Marcela & Fernandes, Erika & Silva, José & Mota, André & Souza, Orestes & Santos, André & Albuquerque, Pedro & Lima, Débora & Mota, R. (2016). Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in backyard chicken breeding in Northeast, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 25. 10.1590/S1984-29612016012.

Ferreira TCR, Buery JC, Moreira NIB, Santos CB, Costa JGL, Pinto LV, Baraviera RCA, Vitor RWA and Fux B (2018) *Toxoplasma gondii*: isolation, biological and molecular characterisation of samples from free-range *Gallus gallus domesticus* from countryside Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 27, 384–389.

Fialho, C.G.; Teixeira M.C.; Araujo, F.A.P.: Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae** Vol.37(1) p. 1-23, 2009.

Gilbert, R.E.; Freeman, K.; Lago, E.G.; Bahia-Oliveira, L.M.G.; Tan, M.K.; Wallon, M.; Buffolano, W.; Stanford, M.R.; Petersen, E. Ocular sequelae of

congenital toxoplasmosis in Brazil compared with europe.
PLOS Neglected Tropical Diseases vol.2, 2008.

Golde, W.T.; Gollobin, P.; Rodriguez, L.L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Lab Animal**. v. 34, n. 9, 2005.

Howe, D.K.; Sibley, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlations of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Disease**. v. 172, p. 1561-1566, 1995.

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, p. 11423-11428, 2006.

Lehmann, T.; Graham, D.H.; Dahl, E.R.; Bahia-Oliveira, L.M.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infectious, Genetics and Evolution**. v. 4, p. 107–114, 2004.

Liu XC, He Y, Han DG, Zhang ZC, Li K, Wang S, Xu LX, Yan RF and Li XR Detection of *Toxoplasma gondii* in chicken and soil of chicken farms in Nanjing region, China. **Infectious Diseases of Poverty** v. 6, p 62, 2017.

Machado, A.S. Análise do perfil imunológico em recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentando diferentes formas clínicas da doença ocular 2014.

Magalhães, F.R.J; Andrade, M.R.; Alcântara, A.M; Junior, J.W.P; Sena, M.J.; Porto, W.J.N.; Veira, R.F.C.; Mota, R.A. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha Island, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology Jaboticabal**, v.25, n. 4, p. 511-515, 2016.

Magalhães, F.J.R.; Andrade, M. R.; Souza, F.M.; Filho, C.D.F.L.; Biono, A.W.; Vidiotto, O.; Navarro, I.T.; Mota, R.A. Seroprevalence and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* infection in cats, dogs, pigs and equines of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Parasitology International**. V.66. p. 43-46, 2017.

Mahmood ZU, Zahid M, Sthanadar AA, Shah M and Hussain A Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in *Gallus domesticus* of district Mardan, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology** v. 46, p. 1705–1710, 2014.

More G., Maksimov P., Pardini L., Herrmann D.C., Bacigalupe D., Maksimov A., Basso W., Conraths F.J., Schares G., Venturini M.C. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. **Veterinary Parasitology**. v.184:116–121. 2012.

Oliveira, P.R.F.; Melo, R.P.B.; Ortega, T.; Silva, R.A.; Oliveira J.E.S.; Almeida, B.G.; Mota, R.A. Investigation of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocyst in urban public environment, in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.79. 2021. 101715. 10.1016/j.cimid.2021.101715.

Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su C. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**. v.38, p. 561-569, 2008.

Ruggiero, M. A.; Gordon, D.P.; Orrel, T.M.; Bailly, N. Bourgoïn, T.; Brusca, R.C.; Cavallier-Smith, T.; Guiry, M.D.; Kirk, P.M. A higher level classification of all living things. **Plos ONE**, v. 10 N. 4, 2015.

Ruiz A. and Frenkel J.K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 29, 1161–1166. 1980.

Saichua P, Jumnainsong A, Tantrawatpan C, Kiatsopit N, Kopolrat K, Suwannatrai A and Sithithaworn P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free range chickens (*Gallus domesticus*) in Khon Kaen province, Thailand. **Tropical Biomedicine** 34, 419–424. 2017.

Schares G., Bangoura B., Randau F., Goroll T., Ludewig M., Maksimov P., Matzkeit B., Sens M., Barwald 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 of Parasitology**. v. 47:765–777. 2017.

Shokri A., Sharif M., Teshnizi S.H., Sarvi S., Rahimi M.T., et al. Birds and poultries toxoplasmosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Asian Pac J Trop Med**. v. 10:635–642. 2017.

Silva, J.C.R. Toxoplasmose. In: CUBAS, Z.S.; SILVA J.C.R.; CATÃO-DIAS J.L. 1.Ed. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p.768-784.

Silva., C.R.; Crima., S.M.; Percio., J.; Borges., J.M.; Moreira., R.V.R.; Pacheco., F.C.; Difante., C.M.; Streb., A.; Farinha., L.B.; Ribeiro., J.S.; Salvagni., E.; Menegolla., I.A.; Kist., P.P.; Zini., L.B.; Haas., S.; Schalleberger., V.; Breganó., R.M.; Freire., R.L.; Navarro, I.T.; Monica, T.C.; Martins., F.D.C.; Pacheco., L.; Vogel., F.S.F; Mineo., J.R.; Cabral., C.M.; Investigação de surto de toxoplasmose associado à contaminação ambiental em Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2018. Rede Brasileira de Pesquisa em Toxoplasmose. IV Simpósio Brasileiro de Toxoplasmose - Brasília -DF, 2018.

Splendore, A. On a new protozoan parasite of rabbits. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1-2, 2009.

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, p. 1- 11, 2010.

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

Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to human. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

Vitaliano, S.N.; Soares, H.S.; Minervino, A.H.H.; Santos, A.L.Q.; Werther, K.; Marvulo, M.F.V.; Siqueira, D.B.; Pena, H.F.J.; Soares, R.M.; Su, C.; Gennari, S.M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 3, p. 276–283, 2014.

Capítulo II: ARTIGO I

Isolamento e identificação de genótipos de *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) comercializadas em mercados populares no estado de Pernambuco, Brasil.

(Artigo a ser submetido a revista Brasileira de Parasitologia Veterinária)

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasito de grande importância devido seu potencial zoonótico. Objetivou-se avaliar presença e viabilidade de *T. gondii* em galinhas destinadas ao consumo humano no estado de Pernambuco, Brasil. Foram coletadas amostras de sangue e tecidos de 25 galinhas comercializadas em mercados em Recife. Utilizou-se a Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Os animais reagentes tiveram encéfalo e coração submetidos ao Bioensaio em camundongos. Os camundongos inoculados foram avaliados por 45 dias, no trigésimo dia pós-inoculação foi coletada amostra de sangue para detecção de soroconversão na RIFI. Os animais foram eutanasiados e aqueles reagentes tiveram o encéfalo e lavado peritoneal avaliados para a pesquisa de cistos e taquizoítos, sendo os materiais subsequentemente inoculados em células MA-104 (ATCC® CRL-2378.1). Os tecidos dos camundongos foram submetidos à PCR para a detecção do gene ITS-1. Obteve-se uma frequência de anticorpos anti-*T. gondii* de 68,00% (17/25) nas aves e soroconversão de 64,70% (22/34) dos camundongos no bioensaio. Sete isolados de *T. gondii* foram confirmados por PCR, dos quais três foram caracterizados na RFLP-PCR como genótipos ToxoDB#36 e ToxoDB#114. Destaca-se a ocorrência do genótipo ToxoDB#36 em galinhas no estado de Pernambuco e a viabilidade do parasito em aves destinadas ao consumo humano.

Palavras-chave: Apicomplexa, bioensaio, genotipagem, saúde-pública, zoonose.

Abstract

Toxoplasma gondii is a parasite of great importance due to its zoonotic potential. The objective was to evaluate the presence and viability of *T. gondii* in chickens intended for human consumption in the Pernambuco state, Brazil. Blood and tissue samples were collected from 25 chickens sold in markets in Recife. We employed the Indirect Immunofluorescence (IFAT) to detect anti-*T. gondii*. The positive animals had their brain and hearts subjected to the Bioassay in mice. The inoculated mice were evaluated for 45 days. On the thirtieth day post-inoculation, blood samples were collected to detect seroconversion in IFAT. The animals were euthanized, and those reagents had their brain and peritoneal lavage evaluated for cysts and tachyzoites. These materials were then inoculated into MA-104 cells (ATCC® CRL-2378.1). The mice tissues were subjected to PCR to detect the ITS-1 gene. We obtained a frequency of anti-*T. gondii* antibodies of 68.00% (17/25) in chickens and seroconversion of 64.70% (22/34) in the bioassay mice. Seven *T. gondii* isolates were confirmed by PCR of which three were characterized by RFLP-PCR as genotypes ToxoDB#36 and ToxoDB#114. We highlight the occurrence of the ToxoDB#36 genotype in chickens in the Pernambuco state and the parasites' viability in chickens intended for human consumption.

.

Keywords: Apicomplexa, bioassay, genotyping, public health, zoonosis.

Introdução

O Brasil possui grande potencial para a produção de alimentos, seja de origem animal ou vegetal. Em 2020 foram abatidos e comercializados 6,0 bilhões de frangos, assim como 3,96 bilhões de dúzias de ovos de galinha (IBGE, 2021). Apesar da situação favorável de mercado e do número significativo de produtores inseridos nessa atividade, diversos problemas existentes nas unidades de produção ainda constituem fatores limitantes para o aumento da produtividade e oferta de produtos (carne, leite e derivados) com a qualidade e a regularidade na oferta exigida pelos consumidores. Dentre os entraves nos sistemas produtivos, os problemas sanitários se constituem em uma das principais causas do baixo desempenho zootécnico e econômico dos rebanhos (Maciel, 2006).

Toxoplasma gondii é um protozoário de distribuição mundial, especulando-se que 60% da população humana esteja infectada (Dubey et al., 2012). Trata-se de um parasito heteroxênico capaz de utilizar qualquer espécie animal homeotérmica como hospedeiro. Seu hospedeiro definitivo são os felídeos, nos quais o parasito é capaz de realizar a fase sexuada de seu ciclo e liberação dos oocistos não esporulados no ambiente. As demais espécies animais atuam como hospedeiros intermediários, onde *T. gondii* realiza apenas a fase assexuada do seu ciclo (Ferguson, 2009).

As galinhas geralmente não apresentam sinais clínicos, mas oferecem risco de transmissão quando há o consumo de sua carne e órgãos crus ou parcialmente cozidos (Ruiz; Frekel, 1980). Além disso são utilizadas como um indicador indireto de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*, uma vez que são amplamente expostas a este protozoário quando exercem o hábito de ciscar o chão (Dubey et al., 2015; Magalhães et al; 2016). O baixo nível de tecnificação nesse tipo de prática agropecuária traz como consequência a exposição dos animais às intempéries do ambiente e a agentes infecciosos (Schaes et al., 2017), entretanto o baixo custo de criação dessas aves é atrativo e estimulante, particularmente entre a população com menos recursos (Cook et al., 2000).

Estudos sobre a estrutura populacional de *T. gondii* têm sido realizados

para elucidar a contribuição da variedade genética sobre características epidemiológicas como transmissão do agente e manifestação de sinais clínicos (Ajzenberg et al., 2004; Lehmann et al., 2004; Lehmann et al., 2006). Os dados obtidos de isolados da América do Sul, principalmente no Brasil, observaram uma alta diversidade genética de *T. gondii*, com predominância de genótipos não clonais (recombinantes ou atípicos). Essa característica decorre da recombinação sexual do parasito, favorecida pela grande biodiversidade presente nestas regiões (Ajzenberg et al., 2004; Su et al., 2006; Pena et al., 2008). Estudos realizados no Brasil ressaltam a diversidade genética encontrada em galinhas na região nordeste, com notável participação dos genótipos #13, #59 e #163 (Feitosa et al., 2016; Silva et al., 2020, Costa et al., 2021). Além disso, genótipos observados podem também ser relatados infectando múltiplas espécies, a exemplo do genótipo #146, já relatado causando infecção em galinhas, garça vaqueira, gatos ferais, ovino e suíno (Dubey et al., 2010; Melo et al., 2016; Silva et al., 2020).

Considerando os riscos existentes na criação extensiva de galinhas que favorecem o contato das aves com o parasito e o desequilíbrio nos biomas na região nordeste do Brasil que pode culminar no aparecimento de isolados mais virulentos de *Toxoplasma gondii*, o presente estudo objetivou isolar e identificar genótipos de *T. gondii* obtidos de galinhas destinadas ao consumo humano comercializadas em mercados públicos no estado de Pernambuco, Brasil.

Material e Métodos

- **Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) com número de protocolo CEUA 1584150622, sendo desenvolvido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo consta também com cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob número A9E4CDE.

- **Coleta de amostras**

Foram coletadas amostras de sangue e tecidos de 25 galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações extensivas comercializadas em mercados públicos no estado de Pernambuco no período de dezembro de 2022 a maio de 2023. As aves utilizadas no presente estudo eram direcionadas ao consumo humano e foram abatidas no local de venda. O sangue foi coletado no momento da sangria das aves e a carcaça inteira foi obtida após processamento do abatedouro.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao laboratório. As amostras de sangue foram coletadas durante a sangria das aves e mantidas em temperatura ambiente até a retração do coágulo. Em seguida foram centrifugadas a 1500 ×g por 10 minutos para obtenção do soro. As amostras de soro foram congeladas até a realização do diagnóstico sorológico.

Os tecidos selecionados para o isolamento do parasito foram encéfalo e coração. As amostras de tecido foram acondicionadas a 4°C até o momento do processamento que foi realizado em até 24h após a coleta.

- **Sorologia e Bioensaio em modelo Murino**

O diagnóstico sorológico das aves foi realizado a partir da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando o protocolo estabelecido por Camargo (1964). Taquizoítos da cepa ME49 foram empregados como antígeno (concentração de 1200-1500 taquizoítos/μL). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX60-FLA, EUA) e foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram fluorescência em toda a superfície do taquizoíto no ponto de corte de 1:16.

Os tecidos das aves reagentes foram submetidos ao bioensaio em modelo murino através do protocolo de digestão péptica estabelecido por Dubey (1998), no qual foi realizado um pool de encéfalo e coração de cada ave reagente para o processo de digestão. Para o bioensaio foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss-webster* cedidos pelo Biotério de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). Os ensaios foram

realizados em duplicata, onde cada amostra foi inoculada em dois camundongos.

Os animais foram observados por 45 dias e durante esse período foram avaliados os sinais de arrepiamento, dor abdominal (afundamento do flanco), ascite, fotossensibilidade ocular, conjuntivite, cianose e sinais de comprometimento neurológico (rotação de cabeça, opistótono e lateralização). Aos 30 dias pós-inoculação (d.p.i.) foi realizada coleta de sangue por punção da veia submandibular (Golde; Gollobin; Rodriguez, 2005) para avaliar ocorrência de soroconversão por meio da RIFI (Camargo, 1964) com ponto de corte 1:16. Após a eutanásia foi realizada a coleta de encéfalo para pesquisa de cistos teciduais. Foi realizado também lavado peritoneal para pesquisa de taquizoítos nos animais que apresentaram sinais clínicos. O mesmo procedimento foi realizado em animais que morreram antes do período de 45 dias de observação. Foi considerada como positiva, toda amostra onde foi possível detectar a presença de anticorpos séricos nos camundongos do bioensaio e o material genético de *T. gondii* nos tecidos dos camundongos (Dubey et al., 2002).

- **Manutenção *in vitro* dos isolados obtidos**

Os encéfalos de camundongos soropositivos na RIFI bem como lavado peritoneal com presença de estruturas compatíveis com taquizoítos foram inoculados em cultura de células MA-104 (ATCC® CRL-2378.1) para isolamento *in vitro*. As culturas foram avaliadas durante um período de 15 dias e aquelas que não apresentaram estruturas compatíveis com taquizoítos livres, placas de lise celular ou vacúolos parasitóforos durante esse período foram descartadas. As culturas que apresentaram as estruturas citadas foram submetidas ao ensaio molecular pela detecção do gene ITS-1 para confirmação do parasito como *T. gondii* (Hurtado et al., 2001). Os isolados confirmados foram então mantidos em cultura e posteriormente congelados em nitrogênio líquido (-196°C).

- **Extração de DNA e PCR**

Foi realizada a extração de DNA de fragmentos de encéfalo e lavado peritoneal dos camundongos, e de amostras de cultura *in vitro* utilizando o *kit*

comercial Wizard DNA Genomic Purification (Promega) conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante. Para extração dos tecidos foram formados *pools* de encéfalo e *pools* de lavado peritoneal dos camundongos em duplicata.

A identificação molecular de *Toxoplasma gondii* foi realizada a partir da detecção do gene ITS-1 conforme o protocolo “*single tube*” Nested-PCR estabelecido por Hurtado et al. (2001), que amplifica um fragmento de 227 pares de base (pb). O perfil térmico das etapas da reação foi realizado em termociclador (XP Thermal Cycler - Bioxer Technology CO. LTD). Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com BlueGreen (LGC®), visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Como controle positivo da reação utilizou-se uma suspensão de taquizoítos da cepa RH e como controle negativo foi utilizada água ultrapura.

- **Caracterização genotípica e filogenia**

A genotipagem foi realizada por meio da técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP-PCR), utilizando-se 10 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico) de acordo Su e Dubey (2020). A sequência do DNA alvo foi primeiramente amplificada por PCR *multiplex* usando os *primers* externos para todos os marcadores, seguido por Nested-PCR para os marcadores individuais. Em seguida, os produtos da Nested-PCR foram digeridos com as enzimas de restrição nas condições de temperatura e de tempo específica para cada marcador. Os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com Syber Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®, USA), visualizados e fotodocumentados pelo Safe Image TM (Invitrogen®, USA). Os resultados foram identificados, comparados, e classificados de acordo com os genótipos presentes em ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). Como controles foram utilizadas as cepas S48 (Tipo I), M4 (Tipo II variante), e NED (Tipo III).

Para análise filogenética, os padrões de bandas da eletroforese (dados genotípicos de polimorfismo de restrição) obtidos pelos cortes das enzimas na PCR-RFLP foram transformados em dados binários (“0”, ausência de banda; “1”,

presença de banda) e tabulados, de acordo com o marcador, no programa de reconstrução filogenética SplitsTree4 (Huson; Bryant, 2006).

Resultados

A frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no ponto de corte 1:16, nas galinhas foi de 68,00% (17/25) de positividade. No trigésimo dia pós inoculação (d.p.i.) dos camundongos, observou-se soroconversão em 64,70% (22/34) animais conforme resultados na Tabela 1. Sinais clínicos como arrepiamento, dor abdominal e sinais oftálmicos foram observados em grau leve a moderado na maioria dos camundongos, com exceção dos camundongos inoculados com amostra G14, que não apresentaram sinais clínicos, e os inoculados da amostra G06. No 5º d.p.i., os camundongos inoculados com a amostra G06 (TgCkBrPe1), apresentaram quadro clínico hiperagudo, caracterizado por arrepiamento, intensa dor abdominal e ascite, sendo eutanasiados. Após realização do lavado peritoneal, foi possível observar estruturas em forma de arco compatíveis com taquizoítos, sendo esta amostra inoculada diretamente em cultura de células MA-104 (ATCC® CRL-2378.1).

Aos 45 d.p.i. foram observadas estruturas compatíveis com cistos com bradizoítos em 01/34 (2,94%) camundongo inoculado. As amostras foram submetidas à detecção do gene ITS-1 (Hurtado et al., 2001) para a confirmação do protozoário, onde 53,84% (7/13) apresentaram amplificação e foram confirmados como *T. gondii*.

Dos sete isolados obtidos no bioensaio, dois (28,00%) foram mantidos com sucesso em cultura de células MA-104 (ATCC® CRL-2378.1) e, posteriormente, congelados em nitrogênio líquido.

Tabela 1: Soroconversão em modelo murino e diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii* em material de bioensaio (Encéfalo e Lavado peritoneal) e cultura *in vitro* a partir da detecção do gene ITS-1.

Amostra	N° Camundongos que			
	sooroconverteram	Lavado Peritoneal	Encéfalo	Cultura Celular
G01	2	-	+	-
G02	0	-	-	-
G04	2	-	-	-
G05	0	-	-	-
G06	0*	+	-	+
G08	0	-	-	-
G09	2	-	-	-
G10	2	-	+	-
G13	2	-	+	-
G14	2	-	+	+
G15	2	-	+	-
G16	2	-	-	-
G17	2	-	-	-
G19	2	-	-	-
G21	0	-	-	-
G22	2	-	+	-
G25	2	-	-	-

*Amostra G06 causou quadro hiperagudo, levando ao óbito os camundongos antes do período necessário para soroconversão. Foi realizada avaliação do lavado peritoneal, observando-se presença de taquizoítos.

Na genotipagem foi possível realizar a caracterização genética de 3 isolados de *T. gondii* (TgCkBrPE1-TgCkBrPE3), identificando-se os genótipos #36 e #114 (Tabela 2). Um dos isolados (TgCkBrPE3) foi parcialmente caracterizado, visto que um marcador genético (PK1) não foi amplificado, no entanto, o perfil genético dos demais marcadores sugere que este isolado pode ser genótipo #114, semelhante ao isolado TgCkBrPE2 obtido neste estudo.

Tabela 2: Caracterização genética por PCR-RFLP de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas destinadas ao consumo humano no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Isolado	Marcadores genéticos											Genótipo (ToxoDB - RFLP)
	SAG1	5'-3' SAG2	Alt.SAG 2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29- 2	L358	PK 1	Apico	
TgCkBrPE1	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	#36
TgCkBrPE2	I	III	III	I	III	III	III	I	III	I	I	#114
TgCkBrPE3	I	III	III	I	III	III	III	I	III	NA	I	Atípico

Discussão

Neste estudo observou-se uma elevada frequência de anticorpos anti-*T. gondii* (68,00%) nas galinhas de criação extensiva, que pode ser justificado pelo manejo dos animais. A frequência de anticorpos encontrada nesse estudo é elevada quando comparada a outros estudos realizados no estado de Pernambuco, como Sá et al. (2017) que obtiveram resultados de 27,9% (176/629) e Fernandes et al. (2016) que obtiveram 40,5% (86/212). Demais estudos realizados no país também demonstraram uma elevada frequência de anticorpos na população de galinhas criadas em sistema extensivo, com destaque para as frequências de 36,0% em Alagoas (Silva et al., 2020); 51,5% em Santa Catarina (Pena et al., 2018) e 53,6% em Minas Gerais (Brandão et al., 2006). Os estudos citados foram realizados com aves criadas em sistema extensivo assim como em nosso estudo. Sabe-se que neste tipo de criação há uma maior exposição das galinhas a agentes infecciosos, dentre eles *T. gondii* (Abbaszadeh et al., 2022).

O hábito de ciscar torna as galinhas um indicador indireto de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* (Dubey, 2010). Além disso, a qualidade da água e alimentos ofertados também interfere diretamente na ocorrência de infecção por *T. gondii* (Shokri et al., 2017). Desta forma, pode-se inferir a presença do parasito viável no ambiente de criação destas aves. Estudos anteriores afirmaram, também, que existe uma relação direta entre a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em galinhas e a ocorrência da toxoplasmose na população humana. Os fatores que interferem nessa correlação são diversos, desde o *status* socioeconômico da população, práticas de higiene com alimentos, o nível de contato direto com o solo e coexistência de espécies animais, em especial os felídeos no ambiente de criação das galinhas (Alvarado-Esquivel et al., 2009; Dubey, 2010; More et al., 2012).

As galinhas são os hospedeiros mais competentes no ciclo biológico de *T. gondii* quando comparado aos camundongos. Isto é justificado pelo maior

tempo de vida desses animais associado à sua resistência quanto a manifestação clínica da infecção (Dubey et al., 2020). Isso permite que com o longo tempo de vida sejam produzidos numerosos cistos contendo grande quantidade de bradizoítos, e quando os felídeos ingerem a carne contaminada desses animais, tendem a liberar uma maior carga de oocistos nas fezes (Dubey et al., 2002; Dubey., 2010; Dubey et al., 2020). Estudos realizados em populações de galinhas criadas em sistemas intensivos costumam relatar uma baixa prevalência justamente devido ao maior controle sanitário e de contato das aves com o solo. Estudo realizado por Cong et al. (2012) na China demonstrou bem essa dinâmica ao comparar a prevalência entre populações de galinhas criadas de forma industrial e criadas em vida livre, onde foram observadas prevalências de 6,2% e 10,2%, respectivamente.

A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* nas galinhas confirma o contato entre o hospedeiro e o parasito, entretanto não indica a existência de cistos teciduais viáveis ou em carga parasitária suficiente para causar uma infecção e soroconversão em modelo murino (Dubey, 2010; Schares et al., 2018; Dubey et al., 2020). Isto pode explicar os casos em que não houve a soroconversão dos camundongos inoculados com tecidos de aves reagentes na sorologia (Tabela 1). Os dois camundongos não apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii*, provavelmente em virtude do tempo insuficiente para a soroconversão, pois estudos anteriores verificaram a detecção de anticorpos IgG em camundongos experimentalmente infectados aos 10 d.p.i (Quan et al., 2009).

A distribuição de cistos de *T. gondii* ocorre preferencialmente em alguns órgãos, podendo variar de acordo com o hospedeiro. Em geral, a musculatura estriada e o sistema nervoso central são os tecidos de eleição para a detecção de *T. gondii*. Em galinhas, o encéfalo e o músculo estriado cardíaco são os tecidos de eleição para realizar a pesquisa direta do parasito, seja por isolamento ou detecção molecular (Scharés et al., 2018). Neste estudo todas as amostras foram processadas em até 24 h após o abate das aves, portanto, provavelmente, o tempo post-mortem não teve interferência sobre a eficácia do isolamento (Scharés et al., 2018; Dubey et al., 2020).

Em nosso estudo, obteve-se uma frequência de isolamento de *T. gondii* em 41,17% (07/17), considerando-se como isolamento positivo toda amostra em

que foi possível detectar a presença de anticorpos séricos nos camundongos do bioensaio, taquizoítos em lavado peritoneal, cistos teciduais em encéfalo ou material genético de *T. gondii* nos tecidos dos camundongo (Dubey et al., 2002), independente do sucesso na manutenção do isolado *in vitro* (Schaes et al., 2018). A presença e a viabilidade de cepas de *T. gondii* em tecidos de galinhas demonstra um risco à saúde da população que consome esses animais. Em um primeiro momento considera-se que o risco da população é relativamente baixo devido ao hábito de preparar a carne de galinhas com bom cozimento por tempo considerável para amolecer o tecido (Cook et al., 2000). Entretanto, é necessário refletir sobre o real impacto da detecção de *T. gondii* no tecido de galinhas e sua correlação com a contaminação ambiental, em especial a contaminação de vegetais e água (Dubey et al., 2020; Abbaszadeh et al., 2022), além do risco de contaminação cruzada entre alimentos durante o preparo das refeições (Cook et al., 2000).

Foi possível realizar a caracterização genética por PCR-RFLP multilocus em três isolados, sendo todos considerados cepas atípicas ou não clonais. Foram identificados os genótipos ToxoDB#36 (TgCkBrPE1) e ToxoDB#114 (TgCkBrPE2), sendo o isolado TgCkBrPE3 considerado como provável genótipo ToxoDB#114 porque não ocorreu a amplificação do marcador Pk1.

A princípio, considerava-se que a diversidade genética de *T. gondii* era baixa, podendo ser classificada em 3 linhagens clonais (I, II e III). Entretanto, avanços em estudos realizados na América do Sul, em especial no Brasil, demonstram a existência de uma grande diversidade de genótipos atípicos (Howe; Sibley, 1995; Shwab et al., 2014). Os estudos no Brasil levaram à identificação de cerca de 253 isolados brasileiros de *T. gondii* que foram classificados em 107 genótipos distintos com os genótipos ToxoDB#59 e ToxoDB#163 como mais frequentes na região nordeste do Brasil (Costa et al., 2021).

O genótipo #36 já foi relatado em *Gallus gallus domesticus* no estado do Espírito Santo (Ferreira et al., 2018), Bahia (Rocha et al., 2018) e Rio de Janeiro (Dubey et al., 2008; Dubey et al., 2020). Esse genótipo #36 (TgCTBr18) foi relatado no estado de Minas Gerais em um caso de toxoplasmose congênita e

classificado como de virulência intermediária (Carneiro et al., 2013). Até o presente estudo, não há relatos da ocorrência do genótipo #36 no estado de Pernambuco. A dispersão de genótipos de *T. gondii* pode ser considerada bastante ampla. O genótipo #146, por exemplo, inicialmente relatado na Ilha de Fernando de Noronha foi posteriormente relatado no estado de Alagoas, localidades separadas não só pela distância, mas também pelo oceano (Dubey et al., 2010; Silva et al., 2020).

O genótipo #114 por sua vez, foi relatado em galinhas e suínos no estado de Alagoas (Ribeiro-Andrade et al., 2019), além de galinhas de vida livre no estado de Pernambuco (Oliveira et al., 2009; Shwab et al., 2014). Notou-se uma distinta variação no perfil clínico apresentado pelos camundongos infectados pelos genótipos identificados. O isolado TgCkBrPE1, associado ao genótipo #36, causou um quadro clínico hiperagudo marcado por ascite, dor abdominal e intenso arrepiamento. Por sua vez, ambos isolados TgCkBrPE2 e TgCkBrPE3, associados ao genótipo #114, causaram mínimo ou nenhum agravo clínico aos camundongos. Esses resultados podem estar associados às características genotípicas das cepas em questão (Abbaszadeh et al., 2022), entretanto, uma vez que o ensaio foi realizado com uma carga parasitária desconhecida, não podemos inferir de fato uma classificação de virulência conforme estabelecido por Saraf et al. (2017).

A análise filogenética (Figura 1) indica que o isolado TgCkBrPE1 (ToxoDB#36) está próximo aos genótipos #13 e #143 que já foram relatados em diferentes espécies no Brasil, principalmente na região Nordeste. Além disso, verifica-se proximidade à linhagem clonal tipo III. Importante destacar que o genótipo #13 já foi descrito com grande frequência em diversas regiões do país, em animais de produção, galinhas e espécies silvestres (Almeida et al., 2017; Clementino-Andrade et al., 2013; Feitosa et al., 2017a, 2017b, 2024; Pena et al., 2011). O isolado TgCkBrPE2 (ToxoDB #114) encontra-se filogeneticamente mais próximo do genótipo #279, que já foi relatado em galinhas do estado de Alagoas, Nordeste do Brasil (Silva et al., 2020), e aproxima-se da linhagem clonal Tipo I.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram a presença e viabilidade de *Toxoplasma gondii* em galinhas comercializadas em mercados populares e destinadas ao consumo humano no estado de Pernambuco, Brasil. Esse resultado tem papel importante na epidemiologia da toxoplasmose na saúde humana e de outras espécies animais que vivem no mesmo ambiente ou que possam ser alimentadas com a carne dessas aves. A presença de genótipos atípicos pode ser atribuída à diversidade genética relatada na região, com destaque para a ocorrência do genótipo ToxoDB#36 em galinhas no estado de Pernambuco.

Referências

Ajzenberg, D.; Banuls, A.L.; Su, C.; Dumetre, A.; Demar, M.; Carme, B.; Dardé, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p. 1185-1196, 2004.

Abbaszadeh S, Teimouri A, Mahmoudi MR, et al. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in chicken hearts from markets and retail stores in Northern Iran. **Food Waterborne Parasitology**. 2022;27: e00166. Published 2022 Jun 3. doi:10.1016/j.fawpar.2022.e00166

Camargo, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 6, 117-118. 1964.

Carneiro, A. C., Andrade, G. M., Costa, J. G., Pinheiro, B. V., Vasconcelos-Santos, D. V., Ferreira, A. M., Su, C., Januário, J. N., & Vitor, R. W. (2013). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, 51(3), 901–907. <https://doi.org/10.1128/JCM.02502-12>

Costa, W. L. G., Barbosa, I. M. F. N., Prado, D. P. G., Domann, N., & Rezende, H. H. A. (2021). A systematic review of *Toxoplasma gondii* genotypes in *Gallus gallus domesticus* worldwide: The focus is Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**. doi:10.1111/tbed.14221

Dubey J.P., Pena H., Cerqueira-Cézar C.K., Murata F., Kwok O., Yang Y.R., Gennari S.M., Su C. Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): the past decade. **Parasitology**. 147(12):1263–1289. 2020. doi: 10.1017/S0031182020001134.

Dubey, J.P.; Lago, E.G.; Gennari, S.M.; Su, C.; Jones, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology† **Parasitology** pp. 1375–1424, 2012

Dubey, J.P. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance August, 2008.

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

Dubey, J. P., Graham, D. H., da Silva, D. S., Lehmann, T., & Bahia-Oliveira, L. M. (2003). *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **The Journal of parasitology**, 89(4), 851–853. <https://doi.org/10.1645/GE-60R>

Dubey, J. P., Rajendran, C., Costa, D. G., Ferreira, L. R., Kwok, O. C., Qu, D., Su, C., Marvulo, M. F., Alves, L. C., Mota, R. A., & Silva, J. C. (2010).

New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **The Journal of parasitology**, 96(4), 709–712. <https://doi.org/10.1645/GE-2425.1>

Fernandes, Marcela & Fernandes, Erika & Silva, José & Mota, André & Souza, Orestes & Santos, André & Albuquerque, Pedro & Lima, Debora & Mota, R. (2016). Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in backyard chicken breeding in Northeast, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 25. 10.1590/S1984-29612016012. FIALHO, C.G.; TEIXEIRA M.C.; ARAUJO, F.A.P.: Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae** Vol.37(1) p. 1-23, 2009.

Ferreira, T. C. R., Buery, J. C., Moreira, N. I. B., Santos, C. B., Costa, J. G. L., Pinto, L. V., Baraviera, R. C. A., Vitor, R. W. A., & Fux, B. (2018). *Toxoplasma gondii*: isolation, biological and molecular characterisation of samples from free-range *Gallus gallus domesticus* from countryside Southeast Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology** 27(3), 384–389. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180028>

Golde, W.T.; Gollobin, P.; Rodriguez, L.L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Lab Animal**. v. 34, n. 9, 2005.

Howe, D.K.; Sibley, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlations of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Disease**. v. 172, p. 1561-1566, 1995.

Huson, D.H.; Bryant, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology Evolution**. v. 23, p. 254-267, 2006.

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, p. 11423-11428, 2006.

Lehmann, T.; Graham, D.H.; Dahl, E.R.; Bahia-Oliveira, L.M.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infectious, Genetics and Evolution.** v. 4, p. 107–114, 2004.

Magalhães, F.R.J; Andrade, M.R.; Alcântara, A.M; Júnior, J.W.P; Sena, M.J.; Porto, W.J.N.; Veira, R.F.C.; Mota, R.A. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha island, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, JaboticabaL v.25, n. 4, p. 511-515, 2016.

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. (2016). Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, 224, 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.023>

More G., Maksimov P., Pardini L., Herrmann D.C., Bacigalupe D., Maksimov A., Basso W., Conraths F.J., Schares G., Venturini M.C. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. **Veterinary Parasitology** vol. 184:116–121. 2012.

Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su C. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology.** v.38, p. 561-569, 2008.

Quan, J. H., Hassan, H. A., Cha, G. H., Shin, D. W., & Lee, Y. H. (2009). Antigenemia and specific IgM and IgG antibody responses in rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. **The Korean journal of parasitology**, 47(4), 409–412. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.4.409>

Ribeiro-Andrade M, de Crasto Souza Carvalho J, Amorim da Silva R, da Conceição Carvalho M, Nascimento Porto WJ and Mota RA (2019) Inter- and intra-genotype differences in induced cystogenesis of recombinant strains of *Toxoplasma gondii* isolated from chicken and pigs. **Experimental Parasitology** vol. 207, 107775.

Rocha, D. S., Nilsson, M. G., Maciel, B. M., Pena, H. F. J., Alves, B. F., Silva, A. V., Gondim, L. F. P., & Albuquerque, G. R. (2018). Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* Isolates from Free-Range Chickens in Bahia, Brazil. **The Journal of parasitology**, 104(4), 377–382. <https://doi.org/10.1645/18-9>

Schares G., Bangoura B., Randau F., Goroll T., Ludewig M., Maksimov P., Matzkeit B., Sens M., Barwald 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 of Parasitology** 2017;47:765–777.

Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, 141(4), 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>

Shokri A., Sharif M., Teshnizi S.H., Sarvi S., Rahimi M.T., et al. Birds and poultries toxoplasmosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Asian Pac Journal of Tropical Medicine**. 2017;10:635–642

Su, C.; Schwab, 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, p. 1- 11, 2010.

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

Considerações Finais

Os resultados obtidos confirmam a presença e viabilidade *Toxoplasma gondii* em galinhas comercializadas em mercados populares no estado de Pernambuco, Brasil. O isolamento de *T. gondii* permite concluir a viabilidade do parasito em amostra de tecido das aves analisadas. A ocorrência e viabilidade de *T. gondii* em galinhas tem papel importante na epidemiologia da toxoplasmose na saúde humana e de outras espécies animais que vivem no mesmo ambiente contaminado.

Foi possível através do presente estudo identificar a presença dos genótipos ToxoDB#36 e #114. A presença de genótipos atípicos pode ser atribuída à diversidade genética relatada na região, com destaque para a ocorrência do genótipo ToxoDB#36 em galinhas no estado de Pernambuco, genótipo o qual já fora anteriormente associado a toxoplasmose congênita em humanos.