ANA FLÁVIA MINUTTI

***TOXOPLASMA GONDII*:**
COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DIRETO E INDIRETO EM GALINHAS CAIPIRAS

Londrina
2018

ANA FLÁVIA MINUTTI

***TOXOPLASMA GONDII*:**

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DIRETO E INDIRETO EM GALINHAS CAIPIRAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina
2018

B222d Sobrenome, Nome do autor.
Gerência de redes – protocolo SNMP / nome e sobrenome do alungo. – Londrina, 2010.
98 f. : il.

Orientador: nome sobrenome do orientador.
Dissertação (Mestrado em) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em xxxxx, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Gerencia de redes – Teses. 2. SNMP. 3 NMS – Teses. 3. Asunto 3 – Teses. I. Sobrenome, Nome do orientador. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU 641:579

ANA FLÁVIA MINUTTI

TOXOPLASMA GONDII:
COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DIRETO E INDIRETO EM GALINHAS CAIPIRAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof. Dr. Andreas L. Chryssafidis
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Dr. Alexey Leon Gomel Bogado
Universidade do Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 28 de fevereiro de 2018.

A minha família, por estar ao meu lado e incentivar todos os meus passos...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente na minha vida, guiando os caminhos a serem seguidos e colocando no meu caminho pessoas capazes de me instruir para meu crescimento.

Aos meus pais, Irineu e Marisa, sem eles nada disso seria possível, por nunca terem medido esforços para eu chegar até aqui. Obrigada por todo amor e ensinamentos, os quais com certeza sempre fizeram com que eu buscasse o caminho do bem, por nunca me deixarem desistir. Obrigada por tudo!

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. João Luis Garcia por toda a orientação desde os tempos de residência, por todos os ensinamentos e disposição.

Ao doutor Alexey Leon Gomel Bogado pelas contribuições e sugestões desse trabalho.

A professora Dra. Roberta Lemos Freire e Dr. Andreas L. Chryssafidis pela presença e contribuições na banca de qualificação.

A minha irmã, Maria Clara, por todo incentivo e amizade, por estar presente na minha vida e agradecer junto ao meu cunhado João Vitor, por terem me dado o melhor presente da minha vida, meu sobrinho e afilhado Antonio que muito me motiva e me faz feliz.

Ao meu namorado, melhor amigo, Luiz Daniel, pelo amor, parceria, carinho, por me ajudar e me fazer feliz, você é a melhor surpresa que aconteceu na minha vida.

Gostaria de agradecer a todos os meus companheiros de laboratório, Thais Cabral, Ana Sue, Felipe, Nelson, Hugo, João Pedro, Priscilla, Mércia, Sérgio, Ana Clécia, por toda ajuda durante os anos de pós graduação.

Agradecer a amiga Beatriz Nino, por me ouvir, aconselhar, ajudar e fazer meu doce preferido e a Carol Miura por compartilhar os momentos de tensão antes da defesa, por me aconselhar e ouvir em vários momentos.

A minha R2 e amiga Thais Agostinho, por tudo que me ajudou e por ter me acolhido quando cheguei na universidade, sempre me tratando da melhor maneira, ate se tornar a amiga que é hoje.

A capes pelo consentimento da bolsa.

Obrigada a todos que contribuiram nesse trabalho.

MINUTTI, Ana Flávia ***Toxoplasma gondii*****:** comparação das técnicas de diagnóstico direto e indireto em galinhas caipiras. 2018. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular cosmopolita que pode infectar todos os animais de sangue quente inclusive o homem. A prevalência da infecção em galinhas caipiras é um bom indicador da presença deste parasito no ambiente. Este trabalho teve como objetivo comparar diferentes técnicas de diagnóstico direto e indireto para detectar *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras criados no Norte do Paraná. As técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação modificada (MAT) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) foram utilizados para a detecção de anticorpos contra *T. gondii.* As aves que apresentaram reação positiva em pelo menos uma das provas sorológicas tiveram um "pool" de órgãos (coração, cérebro, pulmão e fígado) utilizados para isolamento do agente por meio do bioensaio em camundongos. Os sangues totais e tecidos (coração, cérebro, pulmão e fígado), bem como, o material da digestão péptica das galinhas positivas ao bioensaio foram submetidos à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para comparar os marcadores PCR-529pb convencional, *Nested*-PCR ITS1, e qPCR-529pb. Amostras de 386 frangos foram obtidas em 24 propriedades do Paraná. Cento e dezenove aves (30,8%) foram positivas em pelo menos uma das provas sorológicas, sendo 102 (26,4%) na RIFI, 64 (16,6%) no MAT, e 62 (16,0%) no ELISA. A RIFI foi utilizada como padrão ouro, sendo que o MAT apresentou maior sensibilidade (46,0%) e especificidade (94,0%). A realização das provas sorológicas em paralelo demonstrou ser uma boa opção de triagem para o diagnóstico de *T. gondii* em tecidos de galinhas. Nos testes de PCR, o marcador 529pb detectou o DNA do *T. gondii* em 30% (27/90), em ITS1 38,8% (35/90) e em qPCR 40,0% (36/90) das amostras. Como padrão ouro o qPCR-529pb, a sensibilidade foi maior em ITS1 *Nested*-PCR, 69,4% e especificidade em PCR-529pb convencional 90,7%. O MAT e o ELISA tiveram similaridade nas análises de concordância. Dos 18 isolados o órgão que obteve maior positividade foi o coração, seguido do cérebro.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Sorodiagnóstico. PCR. Aves. *Kappa*

MINUTTI, Ana Flávia. ***Toxoplasma gondii*****:** comparison of direct and indirect diagnostic techniques in chicken. 2018. 51 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a cosmopolitan intracellular protozoan that can infect all warm-blooded animals including man. The prevalence of infection in hens is a good indicator of the presence of this parasite in the environment. The objective of this study was to compare different direct and indirect diagnostic techniques to detect Toxoplasma gondii in hens raised in Northern Paraná. Indirect immunofluorescence (IFN), modified agglutination (MAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques were used for the detection of antibodies against T. gondii. Birds that had a positive reaction on at least one of the serological tests had a pool of organs (heart, brain, lung and liver) used for isolation of the agent by means of the bioassay in mice. Total blood and tissues (heart, brain, lung and liver) as well as peptide digestion material from chickens positive for bioassay were subjected to polymerase chain reaction (PCR) to compare the standard PCR-529bp markers, Nested- PCR ITS1, and qPCR-529pb. Samples of 386 chickens were obtained from 24 Paraná properties. One hundred and nineteen birds (30.8%) were positive in at least one of the serological tests, being 102 (26.4%) in the IFAT, 64 (16.6%) in the MAT, and 62 (16.0%) in the ELISA. The RIFI was used as a gold standard, and the MAT had higher sensitivity (46.0%) and specificity (94.0%). Parallel serological tests proved to be a good screening option for the diagnosis of T. gondii in chicken tissues. In the PCR tests, the 529bp marker detected the T. gondii DNA in 30% (27/90), in ITS1 38.8% (35/90) and in qPCR 40.0% (36/90) of the samples. As the gold standard qPCR-529pb, the sensitivity was higher in ITS1 Nested-PCR, 69.4% and specificity in conventional PCR-529bp 90.7%. MAT and ELISA had similarity in concordance analyzes. Of the 18 isolates, the organ that obtained the highest positivity was the heart, followed by the brain

Keywords: Toxoplasmosis. Serodiagnosis. PCR. Birds. *Kappa*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados nas diferentes técnicas de PCR 41

Tabela 2 - Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice *Kappa* da RIFI, MAT e ELISA utilizando como padrão ouro a RIFI 43

Tabela 3 - Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice *Kappa* dos marcadores de PCR utilizando como padrão o qPCR 45

Tabela 4 - Resultado das diferentes técnicas de PCR dos diferentes tecidos de galinhas isoladas de *T. gondii* no bioensaio e análise de concordância entre os marcadores moleculares. 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das propriedades na Região Norte do Estado do Paraná.....36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.1 TOXOPLASMA GONDII 13
2.1.1 Sistema Colonial / Caipira 17
2.1.2 Toxoplasma gondii em Gallus gallus domesticus 17
2.1.3 Diagnóstico 19
2.1.4 Referências 22

3 OBJETIVOS 31
3.1 OBJETIVO GERAL 31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO 31

4 ARTIGO - Comparação entre técnicas de diagnóstico direto e indireto para detectar *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras 32

5 CONCLUSÃO 48

6 APÊNDICE A 54

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular que infecta a maioria dos animais de sangue quente (DUBEY; BEATTIE, 1988). Após o descobrimento desse parasita em 1908 (SPLENDORE, 1908), vários isolamentos foram feitos em diferentes vertebrados, onde acreditava-se que poderiam ser diferentes espécies, porém, Sabin (1939) verificou que se tratava de uma única espécie, *T. gondii.*

Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos do parasita (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970), sendo os gatos domésticos os de maior importância, devido ao estreito contato com os seres humanos (GARCIA, 2009). Esses animais eliminam oocistos pelas fezes, que após esporulação, podem infectar os animais e o homem pela ingestão de alimento ou água contaminada. Além da transmissão horizontal, pode ocorrer o carnivorismo, que é a ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida, ou ainda a transmissão vertical, que é a passagem de taquizoítos da mãe para o feto (DUBEY e BEATTIE, 1988).

As consequências clínicas da infecção por *T. gondii* dependem de fatores ligados ao hospedeiro como a suscetibilidade à infecção e o estado imunológico, e a fatores ligados ao parasito, como a dose infectante, a via de transmissão, a forma parasitária e o genótipo que influencia a patogenicidade (DUBEY et al., 2002).

As alterações em animais de produção estão relacionadas principalmente à reprodução, sendo mais susceptíveis os caprinos, ovinos e suínos (DUBEY; KIRKBRIDE, 1984; DUBEY; ADAMS, 1990; VIDOTTO et al., 1987). As galinhas são consideradas clinicamente resistentes à toxoplasmose, porém a ingestão de seus tecidos contaminados por gatos provoca grande eliminação de oocistos no ambiente, portanto, as galinhas têm um papel importante na epidemiologia do *T. gondii* (DUBEY, 2010).

Neste sentido, por se alimentarem no chão, as aves criadas de forma semi-intensiva possuem contato com o ambiente externo, e consequentemente têm maior chance de ingestão de oocistos. Sendo assim, a prevalência de *T. gondii* em galinhas tipo colonial/caipira é um bom indicador do nível de presença de oocistos deste protozoário no meio ambiente (DUBEY *et al.*, 2003b).

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* pode ser feito por meio de técnicas indiretas: como os exames sorológicos; e diretas: como a microscopia, técnicas histológicas, bioensaio e PCR (DUBEY, 2010; HOLSBACK, 2012). Dubey et al. (1993), estudando o *T. gondii* por meio de inoculações experimentais em galinhas, confirmaram que esses animais podem desenvolver anticorpos contra o *T. gondii,* bem como exibir cistos teciduais em cérebro, coração e musculatura (DUBEY et al., 2003b; 2007; DUBEY, 2010b; HOLSBACK, 2012)

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii, é um parasita intracelular obrigatório e que infecta todos os animais homeotérmicos, incluindo o homem, animais domésticos, silvestres e as aves (DUBEY e BEATTIE, 1988). Pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Coccidia, ordem Eucoccidiida, sub-ordem Eimeriiorina, família Sarcocystidae, sub-família Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (LEVINE, 1985). Foi descrito pela primeira vez em 1908 concomitantemente por Splendore no Brasil, e por Nicolle e Manceaux na Tunísia. No Instituto Biológico de São Paulo, no Brasil, Splendore isolou o agente de um coelho de laboratório. No mesmo ano, no Instituto Pasteur de Tunis, na Tunísia, os pesquisadores franceses isolaram o parasita de um roedor africano da espécie *Ctenodactylus gundi,* entretanto o classificaram como *Leishmania gondii*. Porém, em 1909, baseado em estudo morfológicos, os pesquisadores franceses re-classificaram o parasita em referencia ao formato, que no grego “toxon” significa arco, como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909).

Após a classificação do gênero *Toxoplasma,* alguns pesquisadores isolaram o agente de diversos animais, classificando-o de acordo com a espécie hospedeira (*T. canis, T. gallinarum, T. avium. T. columbae,* entre outros). Entretanto, em 1939, Sabin trabalhando com camundongos concluiu que se tratava apenas de uma única espécie, o *T. gondii.*

É uma importante zoonose de distribuição cosmopolita, e segundo Tenter, Heckeroth e Weiss (2000), quase um terço da população humana já foi exposta ao parasita em alguma fase da vida. A infecção geralmente é assintomática em indivíduos saudáveis, principalmente devido à resposta imune celular, que estabelece uma infecção crônica controlando a multiplicação dos taquizoítos, levando à formação de cistos teciduais, que se mantem latentes e viáveis por longo período de tempo (YAP, SHER, 1999). Os sintomas como mal-estar, febre, linfadenopatia, mialgia, encefalite e miocardite são manifestados em uma minoria de indivíduos saudáveis quando infectados (MONTOYA e LIESENFELD, 2004;

REMINGTON et al., 2006). Além disto, pode desenvolver algum tipo de lesão ocular, principalmente retinocoroidite (HOLLAND, 2003).

Os gatos e todos os membros da Família Felidae são os únicos hospedeiros definitivos do parasita, pois é nas células enteroepiteliais destes animais que ocorre a fase sexuada, conhecida como gametogonia (FRENKEL, DUBEY, MILLER, 1970). Nos hospedeiros intermediários ocorre à fase assexuada do parasita, conhecida como endodiogenia. Trata-se de um parasito com ciclo de vida heteroxeno facultativo, pois pode apresentar mais de um hospedeiro.

Existem três formas do parasita: os oocistos, contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada; os taquizoítos, presentes nos vacúolos parasitóforos e fluídos corporais na fase aguda e os bradizoítos, dentro de cistos teciduais na fase crônica da infecção (DUBEY, BEATTIE, 1988; DUBEY, 2004).

Após a ingestão pelo hospedeiro, a parede externa de cistos ou oocistos é quebrada pela ação de enzimas proteolíticas e as formas infectantes (bradizoítos ou esporozoítos) são liberadas no lúmen intestinal (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). No intestino, elas penetram nas células epiteliais iniciando a multiplicação do parasito por endodiogenia, originando os taquizoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). O taquizoíto é a forma parasitária que está presente na fase aguda da infecção e possui um formato arqueado e com um tamanho de aproximadamente 2µm x 6µm, sendo formado por um núcleo, diversas organelas, uma membrana plasmática externa e uma membrana interna descontínua e com várias fenestrações (DUBEY, 2004). Quando penetra nas células nucleadas por penetração ativa, forma um vacúolo parasitóforo que o protege do sistema imune do hospedeiro, e multiplica-se rapidamente por endodiogenia até que ocorra a ruptura da célula e liberação dos taquizoítos (DUBEY, 2004). Ocorre então, a disseminação do parasito no organismo do hospedeiro via circulação sanguínea e linfática. De acordo com a virulência da cepa de *T. gondii* envolvida na infecção, a taxa de invasão e crescimento dos taquizoítos é variável (APPLEFORD; SMITH, 1997). Com desenvolvimento da resposta imunológica, inicia-se uma resposta que atua diretamente sobre a multiplicação dos taquizoítos, os quais passam a se dividirem lentamente e são denominados de bradizoítos (FRENKEL, 1988).

Desta forma, inicia-se uma fase da infecção crônica, que tem como resultado formação de cistos teciduais. Esses cistos crescem e permanecem no interior da célula (DUBEY, LINDSAY, SPEER, 1998). Os bradizoítos são diferentes

dos taquizoítos, pois apresentam um núcleo situado na região posterior e são mais finos e resistentes que os taquizoítos a ação das enzimas proteolíticas (DUBEY, 2004). Estes cistos localizam-se preferencialmente no tecido neural e muscular. Apesar de a fase crônica persistir por toda a vida do hospedeiro, segundo Dubey Lindsay, Speer (1998), o cisto tecidual pode romper-se de períodos em períodos, invadindo novas células e formando novos cistos.

No intestino delgado dos hospedeiros definitivos ocorre a evolução da fase sexuada. Quando um felino ingere cistos ou oocistos, os bradizoítos ou esporozoítos liberados, uma parte deles penetra nas células epiteliais do intestino delgado e se multiplicam em numerosos ciclos sexuados e assexuados (DUBEY, 2008; BLACK; BLOOTHROYD, 2000). Os esquizontes originados do ciclo enteroepitelial da reprodução sexuada, liberam merozoítos, que dão origem às formas sexuadas chamadas de gametócitos. Os gametócitos originam os gametas masculinos, que são móveis, estes flagelados e saem da célula hospedeira para fecundar os gametas femininos, estes também são formados a partir dos gametócitos e permanecem no interior da célula. Após a fecundação, há a formação do zigoto, envolto por uma parede resistente dando origem ao oocisto (DUBEY, 1986).

Esses oocistos são eliminados nas fezes na forma não esporulada e não infectante. Dependendo de ótimas condições ambientais de temperatura e umidade ocorre à esporulação no ambiente em torno de um a cinco dias (DUBEY, 2004). De acordo com LINDSAY, BLAGBURN e DUBEY (1997), as melhores condições para esporulação são 65% de umidade relativa e 20ºC de temperatura ambiente. Oocistos esporulados possuem uma morfologia de sub-esférico a esférico, 10x12µm de diâmetro, dois esporocistos, sendo que cada esporocisto contêm quatro esporozoítos 2x8µm (DUBEY, LINDSAY, SPEER, 1998).

Através da ingestão de cistos teciduais de animais infectados, alimento ou água contaminada com oocistos esporulados ou por meio da infecção transplacentária, os hospedeiros intermediários podem adquirir *T. gondii* (DUBEY, 2004). A principal via de transmissão para humanos é a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos presentes na carne crua ou mal passada, sendo também a principal via para os gatos que ingerem carne e vísceras cruas ou presas (ratos, pombos, por exemplo) (DUBEY, 1994a; DUBEY, FRENKEL, 1998).

O oocisto pode sobreviver viável no ambiente por muito tempo, sendo resistente à maioria dos desinfetantes (DUBEY, 2009). Oocistos também podem ser dispersos por baratas, moscas e minhocas no ambiente, contaminando diretamente os alimentos (CHINCHILLA et al., 1994).

A transmissão transplacentária acontece quando ocorre a infecção durante a gestação das fêmeas soronegativas, elas adquirem a infecção (HILL, DUBEY, 2002). Após um tempo de parasitemia na mãe, os taquizoítos penetram na placenta e se disseminam pelos tecidos do feto.

Também são vias de transmissão do *T. gondii,* porém pouco frequentes, a transfusão sanguínea, acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos e a ingestão leite não pasteurizado, principalmente de cabra, (CHIARI, NEVES, 1984; DRESSEN, 1990; WONG, REMINGTON, 1993; BONAMETTI et al., 1997; RENOULT et al., 1997; FIGUEROA-DAMINA, 1998; MUNIR, ZAMAN, ELTORKY, 2000).

Geralmente, *T. gondii* parasita o hospedeiro sem causar sinais clínicos, entretanto, em alguns casos, o protozoário pode provocar doença grave, principalmente quando ocorre transmissão congênita e nos casos de reativação de infecções latentes em indivíduos imunossuprimidos. Tanto nos humanos como em animais, a infecção primária durante a gestação causa abortos, debilidade e mortalidade neonatal, sendo uma das principais causas de perdas em rebanhos de pequenos ruminantes e suínos (DUBEY et al., 1980; DUBEY; BEATTIE, 1988; FREYRE et al 1999; DUNCANSON et al., 2001; WEISSMANN, 2003). A toxoplasmose é considerada emergente e tem sido relatada como séria infecção oportunista em indivíduos imunossuprimidos. A prevalência da toxoplasmose em pacientes positivos para HIV chega a 80%, e 4,8% com histórico de neurotoxoplasmose e 1,6% de toxoplasmose ocular (XAVIER et al., 2013).

As galinhas são classificadas como clinicamente resistentes à toxoplasmose (DUBEY, 2010). No estado do Paraná, a ocorrência de *T. gondii* tem sido descrita em ovinos, caprinos e suínos que estão entre os animais de produção mais importantes na epidemiologia da toxoplasmose (VIDOTTO et al., 1990; TSUTSUI, 2003; REIS et al., 2007; ROMANELLI et al., 2007). Da mesma forma, em outras aves, a infecção por *T. gondii* tem sido relatadas tanto por soroprevalência quanto por isolamento. Garcia et al. (2000) demonstraram a ocorrência de 10,3% de

reações positivas em soros de galinhas criadas para subsistência em Jaguapitã – PR.

Galinhas têm um papel na epidemiologia do *T. gondii* no ambiente rural, já que elas são clinicamente resistentes à infecção, e a ingestão de seus tecidos infectados pelos gatos causa grande eliminação de oocistos nas fezes dos felinos no ambiente (DUBEY, 2010).

Assim, as aves criadas de forma semi-intensiva, por possuírem contato com o ambiente externo ao galpão, tem maior chance de ingestão de oocistos. Portanto, a prevalência de *T. gondii* em galinhas tipo colonial/caipira é um bom indicador do nível contaminação ambiental por oocistos (DUBEY *et al.*, 2003b).

2.1.1. Sistema Colonial / Caipira

O sistema colonial/caipira é caracterizado respeitando o bem estar, por uma criação semi-intensiva das aves relacionada com a agricultura familiar que permite maior bem estar aos animais, no intuito de obter uma carne de características diferenciadas da carne derivada da avicultura industrial intensiva. Este sistema imita ao máximo as condições de vida naturais das aves. O sistema tipo colonial/caipira é também chamada de capoeira na região nordeste do Brasil e “Label Rouge” na França (CARDOZO; YAMAMURA, 2004).

A regulamentação deste sistema de criação foi feita pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento - DIPOA (BRASIL, 1999) definindo o limite de 25 dias de confinamento às aves dando a elas depois este período, o acesso a piquetes para pastoreio com espaço mínimo de $3m^2$ ou $1m^2$ por ave se houver rotação de piquetes, mínimo de 6 a 8 horas em lugar aberto, e idade mínima para abate de 85 dias.

Assim, o contato com o ambiente externo ao barracão, favorece a possibilidade de infecção por oocistos. Portanto, o *T. gondii* é mais frequentemente encontrado em galinhas caipiras do que em galinhas criadas de forma intensiva, uma vez que as caipiras estão mais expostas à contaminação ambiental por oocistos (DUBEY, 2010 a; DUBEY et al., 2005).

2.1.2. Toxoplasma Gondii em Gallus Gallus Domesticus

Várias espécies de aves domésticas e silvestres apresentaram sorologia positiva para *T. gondii*, a exemplo de anseriformes (patos), accipitriformes (gaviões, abrutes, urubus e falcões), galiformes (perdizes, faisões, perus e galinhas), gruiformes (carquejas), charadriiformes (gaivotas e andorinhas), columbiformes (pombos e rolas), strigiformes (corujas) e passeriformes (pardais) (DUBEY, 2002).

Fatores como a idade da ave, número de animais examinados e tipo de criação causam variação nos resultados de prevalência (ZHU et al, 2008; DUBEY, 2010; MILLAR, 2012). Portanto, há menor ocorrência em aves confinadas que em criadas em sistema extensivo, podendo chegar a 100% de prevalência (DUBEY; JONES, 2008).

Outro aspecto relacionado à prevalência da infecção pelo protozoário em aves é de que esses animais sendo um reservatório do agente, participam da transmissão de *T. gondii* aos carnívoros, importante na epidemiologia da toxoplasmose. Alguns estudos (CAMARGO et al., 1995; CAVALCANTI et al., 2006; DUBEY et al., 2003b; DUBEY et al., 2006a) indicam essas aves como fonte de infecção direta para humanos. Além disso, assume importância no ciclo de vida de *T. gondii*, considerados importante fonte de cistos desses protozoários para os gatos domésticos, em razão do habito predatório do gato (DUBEY; FRENKEL, 1998).

As galinhas têm sido usadas como ótimos bioindicadores de contaminação ambiental, por indicarem a presença de oocistos eliminados pelos gatos no ambiente (DUBEY et al., 2007; DUBEY, 2010a). Por se alimentarem no solo as galinhas ingerem estas formas infectantes (RUÍZ; FRENKEL, 1980).

Diversos autores realizaram estudos soroepidemiológicos com aves do Brasil. Garcia et al. (2000), encontraram resposta sorológica para *T. gondii* por meio da RIFI no Paraná. Bona et al. (2006) e Millar et al. (2012), no Rio de Janeiro, encontraram uma associação entre a presença de gatos e a infecção por *T. gondii* em frangos. Assim como Silva et al. (2003), verificaram uma prevalência de 65% da infecção em galinhas em área endêmica de toxoplasmose humana indicando grande contaminação do ambiente por oocistos

Embora muito incomum algumas aves podem apresentar sinais clínicos da infecção, como anorexia, torcicolo, perda de visão e paralisia (DUBEY et al., 2007a). Através de uma infecção experimental por ingestão de oocistos em

pintos de cinco dias de vida pode-se observar um quadro agudo com anorexia, diarreia e perda de peso, com acometimento principalmente do intestino, fígado e pulmão (RUÍZ; CHINCHILLA; GERRERO, 2005). Foram descritos também sinais nervosos em galinhas caipiras, sendo que após necropsia de um animal, cistos teciduais e taquizoítos foram observados (DUBEY, 2007a).

.

2.1.3. Diagnóstico

Os diagnósticos sorológicos permitem altos rendimentos com baixos custos e são muito utilizados para triagens (GAMBLE et al, 2005).

O teste de Sabin-Feldman, “Dye Test”, foi o primeiro disponível para detecção de anticorpos específicos anti-*T. gondii*, introduzido em 1948. Sua realização depende do uso de taquizoítos vivos como antígeno, soro suspeito, fator acessório e azul de metileno; o teste possui boa sensibilidade e especificidade, mas deixou de ser utilizado como rotina, devido ao uso de parasitos vivos, que aumenta o risco de infecção do pessoal técnico (TENTER et al, 2000).

A técnica de aglutinação modificada (MAT) é considerada o teste de eleição para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, devido á sua facilidade de uso e por não necessitar de um conjugado espécie-específico, além da praticidade, dispensar o uso de equipamentos. É um teste que apresenta alta sensibilidade e especificidade (CAMARGO et al. 1978; SHAAPAN et al., 2008; CENCI-GOGA et al., 2011).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é uma técnica de alta aceitação, podendo ser utilizada para diagnósticos, inquéritos e levantamentos epidemiológicos, por ser de fácil realização e ter alta sensibilidade. Faz-se necessário o uso de antígenos, taquizoítos tratados com formalina, além de conjugados espécie-específicos. Apresentam algumas vantagens em relação aos demais testes sorodiagnósticos como, por permitir a quantificação de anticorpos. Porém, a dificuldade de automação, dependência de cultivos celulares e de equipamento específico (microscópio de fluorescência), além da necessidade de técnicos treinados para a leitura (subjetividade de interpretação) são algumas desvantagens deste método (SILVA et al., 2002; SHAAPAN et al., 2008).

O ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), introduzido por VOLLER et al. (1976), é a reação de soros testes com antígenos, mediante a sua

adsorção em de microplacas, sendo considerado um método de fácil aplicação e de alta sensibilidade e especificidade, além de proporcionar a realização de um número maior de amostras, podendo ser automatizado, o que faz com que o teste se torne mais atrativo para o uso em estudos epidemiológicos de larga escala. Há necessidade de espectrofotômetro de placa para leitura da reação. Muitos kits de ELISA estão disponíveis comercialmente para detecção de anticorpos em diferentes espécies animais (CENCI-GOGA et al., 2011; VITALIANO, 2007).

O isolamento do *T. gondii* por bioensaio em camundongos e gatos com tecidos de galinhas infectadas tem sido descrito em vários países, evidenciando a importância das galinhas na epidemiologia do parasito (DUBEY; SU, 2009). Os tecidos mais frequentemente utilizados são coração, pulmão, baço e cérebro. A fim de aumentar a taxa de recuperação do parasito, para detecção de cistos teciduais nos hospedeiros, a digestão de tecidos e o bioensaio em camundongos podem ser utilizados (DUBEY, 1998; DUBEY; THULLIEZ, POWELL,1995). A digestão de tecidos de um hospedeiro em pepsina permite um exame de maior quantidade de material, que dissolve a parede dos cistos e libera os bradizoítos (DUBEY, 1997). As amostras virulentas de *T. gondii* causam a morte dos camundongos, e induzem infecção aguda, sendo possível identificar taquizoítos nos pulmões, liquido peritoneal e cérebro. As amostras avirulentas causam infecção crônica, sendo observados cistos no cérebro e anticorpos específicos (DUBEY & BEATTIE, 1988).

É possível diagnosticar a infecção por *T. gondii* em frangos caipiras de forma eficaz por bioensaio. Os tecidos de galinhas (coração, cérebro e músculos) contendo cistos de *T. gondii* são aptos a infectar camundongos e gatos (DUBEY et al., 2003b; 2007; DUBEY, 2010b; HOLSBACK, 2012) comprovando a infecção nas aves.

As técnicas moleculares tem utilidade para detecção de agentes infecciosos em tecidos e secreções de animais, possibilitando identificar DNA ou RNA específicos, informações que não podem ser obtidas de testes imunológicos ou morfológicos (SINGH, 1997).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é muito utilizada para detecção de DNA do parasita em sangue, tecidos e secreções. Até alguns anos atrás, estudos baseavam-se na amplificação de genes com poucas cópias no genoma de *T. gondii*, sendo um dos mais utilizados o gene SAG1, com apenas uma cópia, seguido pelo gene B1 com 35 cópias (LIN et al., 2000). Atualmente, estudos

utilizam o gene repetitivo de 529 pares de base, que apresenta de 200 a 300 cópias no genoma do parasito (HOMAN et al., 2000).

A especificidade da PCR é aproximadamente de 100%, mas pode haver uma sensibilidade limitada, pela dificuldade de extrair o DNA e concentrar a amostra (ALFONSO et al., 2009). Portanto, para aumentar a sensibilidade da caracterização molecular do *T. gondii*, a PCR pode ser aperfeiçoada com mais uma reação, a *Nested*-PCR. A técnica de *Nested*-PCR é realizada com duas reações de amplificação, com um par de primers para cada reação. As duas amplificações aumentam a sensibilidade e tem sido usadas com sucesso para detecção especifica de protozoários coccídeos (ELLIS et al., 1999; MEDINA et al., 2006).

A PCR em Tempo Real (qPCR) foi recentemente introduzida para o diagnóstico da toxoplasmose. É uma metodologia rápida, sensível e quantitativa de detecção do *T. gondii* em amostras clínicas (KOMPALIC-CRISTO, BRITTO, FERNANDES, 2005). A abordagem qPCR ganhou popularidade por não só detectar, mas também por quantificar o DNA de *T. gondii* em amostras biológicas (BELL E RANFORD-CARTWRIGHT, 2002; CONTINI ET AL, 2005). O elemento de 529 pb é um alvo preferido para qPCR, atualmente representando o teste mais sensível para a detecção de *T. gondii* (KASPER ET AL., 2009).

2.1.4 Referências

ABRAHAMS-SANDÍ, E.; VARGAS-BRENES, O. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens from Costa Rica. **Tropical Animal Health and Production**. n. 37, p. 369-372, 2005.

ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; JIMÉNEZ, N.; FONSECA, C.; DORTACONTRERAS, A.J.; COX, R.; CAPÓ, V.; BANDERA, F.; POMIER, O.; GINORIO, D. Detection of Toxoplasma gondii in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. **Experimental Parasitology**, v. 122; p. 203-207, 2009.

APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. **Acta tropica**, v. 65, n. 2, p. 97–104, maio, 1997.

BELL, A. AND RANFORD-CARTWRIGHT, L. Real-time quantitative PCR in parasitology. **Trends in Parasitology** 18, 337–342, 2002.

BLACK MW, BOOTHROYD JC. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**;64(3):607-623, 2000.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K.; MACEDO, Z.S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. **Journal of Tropical Pediatrics.** v.43, p. 116, 1997.

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

BOPHALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.26, p.213-222, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Ofício Circular DOI/DIPOA nº007/99, de 19 de maio de 1999**. Dispõe sobre Registro do Produto "Frango Caipira ou Frango Colonial" ou "Frango Tipo ou Estilo Caipira" ou "Tipo ou Estilo Colonial". Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999.

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

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K.; NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and Immunity**, v.21, p.55-8, 1978.

CARDOZO, S. P.; YAMAMURA, M. H. Parasitas em produção de frangos no sistema tipo colonial/caipira no Brasil. **Semina:** Ciências Agrárias, Londrina, v. 25, n. 1, p. 63-74, jan./mar. 2004.

CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; ANDRADE, H. F.; MEIRELLES, L. R.; DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.92, p.647-649, 2006.

CENCI-GOGA, B.T.; ROSSITO, P.V.; SECHI, P.; McCRINDLE, C.M.E; CULLOR, J.S. *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 8, n. 7, 2011.

CONTINI, C., SERACENI, S., CULTRERA, R., INCORVAIA, C., SEBASTIANI, A. AND PICOT, S. Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. **International Journal for Parasitology**, 35, 275–283, 2005.

CHIARI, C.A; NEVES, D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 79, p. 337-340, 1984.

CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O. M.; CASTRO, A.; SABAH, J. Cockroaches astransport hosts of protozoan *Toxoplasma gondii*. **Revista de Biologia Tropical**, v.42, p. 329-331, 1994.

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

DRESSEN, D.W. *Toxoplasma gondii*. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 196, n. 2, p. 274-276, 1990.

DUBEY, J. P Toxoplasmosis in cats. **Feline Practice**, v.16, p.12-26,1986.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier, J.P. **Parasitic Protozoa**. v.6. San Diego: Academic Press, p. 1-158, 1993.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593–1598, 1994.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of Toxoplasma gondii. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 44, p. 592-602, 1997.

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology,** v. 126, p. 57-72, 2004.
DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p, 2009.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. **Zoonoses Public Health**, v.57, p.60-73, 2010.

DUBEY, J.P., KIRKBRIDE, C.A. Epizootics of ovine abortion due to *Toxoplasma gondii* in north central United States. **Journal American Veterinary Medicine Association**. n.184, p.657–660, 1984.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man.** CRC Press, Boca Raton, FL. p. 1–220, 1988.

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

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

DUBEY, J.P.; JONES. J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology.** n. 38, p.1257–1278, 2008.

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

DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., POWELL, E.C.,. Toxoplasma gondii in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of T. gondii by bioassays in mice and cats. **Journal of Parasitology**. 81, 48–53, 1995.

DUBEY, J. P.; WILLIAMS, J.F.; WEISBRODE, S. E. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.1072-1076, 1980.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

DUBEY J.P., RUFF M.D., CAMARGO M.E. SHEN S.K, WILKINS G.L, KWOK O.C., THULLIEZ P**.** Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. **American journal of veterinary research**, v. 54, n. 10, p. 1668-1672, 1993.

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

DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.; HILALI, M.; EL-GHAYSH, A.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. **Veterinary Parasitology.** n.114, p. 89–95, 2003a

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

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; PISCOPO, M.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* From Free-Ranging Chickens From Argentina. **Journal of Parasitology***,* n. 89, n.5, p. 1063–1064, 2003c.

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

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

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

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

DUBEY, J.P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O.C.H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology.** n. 134, p. 1559–1565, 2007.

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

DUNCANSON, R. S.; TERRY, J. E.; SMITH, G. H. High levels of congenital transmission of Toxoplasma gondii in a commercial sheep flock. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1699-1703, 2001.

ELLIS, J. T. MCMILLAN D., RYCE C., PAYNE S., ATKINSON R., HARPER P.A., Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of Neospora caninum DNA. **International Journal for Parasitology**., v. 29, p. 1589-1596, 1999.

FIGUEROA DAMIAN, R. Risk of transmission of infectious diseases by transfusion. **Ginecología y Obstetricia de México.** v. 66, p. 277-283, 1998.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 4, n. 10, p. 273–278, out. 1988.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identifed as coccidian oocysts. **Science**, v.167, p. 893-896, 1970.

FREYRE, A.; BONINO, J.; FALCON, J.; CASTELLS, D.; CORREA, O.; CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.81, p.85-88, 1999.

GAMBLE, H. R. Dubey J.P, Lambillotte D.N., Comparision of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of Toxoplasma infections in the domestic pig. **Veterinary parasitology,** v. 128, p. 177-181, 2005.

GARCIA, J. L. . Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, p. 215-225, 2009.

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

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Annali dell'nstituto Superior di Sanità,** v.40, p.65-70, 2004.

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

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

HOLSBACK, L; PENA, H.F.J.; RAGOZO, A.; LOPES, E.G.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.. Serologic and molecular diagnostic and bioassay in mice for detection of Toxoplasma gondii in free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n. 32, v. 8, p.721-726, 2012.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **American Journal Ophthalmology.** v. 136, 973–988, 2003.

KASPER, D. C., SADEGHI, K., PRUSA, A.-R., REISCHER, G. H., KRATOCHWILL, K., FORSTER-WALDL, E., GERSTL, N., HAYDE, M., POLLAK, A. AND HERKNER, K. R. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 63, 10–15, 2009.

KOMPALIC-CRISTO A., BRITTO C., FERNANDES O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **J Bras Patol Med Lab** 41: 229-235, 2005.

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

LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology.** Ames, Iowa StateUniversity Press, EUA, 1985.

LIN, M. H., CHEN T.C., KUO T.T, TSENG C.C, TSENG C.P. Real-time PCR for quantitative detection of Toxoplasma gondii. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4121-4125, 2000.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and the importance of *Toxoplasma gondii* oocyst. **Compendium on Continuing Education for the Praticing Veterinarian** v. 19, n. 4, p. 448-461, 1997.

LINDSTRÖM, I.; SUNDAR, N.; LINDH, J.; KIRONDE, F.; KABASA, J. D.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P.; SMITH, J. E. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. **Parasitology**. n.135, p. 39–45, 2007.

LIU, Q.; NEI, F.; GAO, S.; JIANG, L.; LAIN, H.; YUAN, B.; XIA, Z.; LIU, B.; XU, X.; ZHU,X. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. **Transactions of the RoyalSociety of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 103, p. 162-166, 2009.

MEDINA, L. CRUZ-VÁZQUEZ C., QUEZADA T., MORALES E., GARCÍA-VÁZQUEZ Z.. Survey of Neospora caninum infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 187-191, 2006.

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

MONTOYA, J.G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. 363, p. 1965-1976, 2004.

MUNIR, A.; ZAMAN, M.; ELTORKY, M. *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pâncreas transplant patient. **Southern Medical Journal.** v. 93, p. 614-617, 2000.

NICOLLE, C; MANCEAUX, L. Sur une infection á corps de *Leishman* (ou organisms voisins) du *gondii*. **Compets Rendus de l'Académie des Science.** v. 147, p. 763,1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L.. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Compets Rendus de l'Académie des Science.** v. 148, p. 369, 1909.

REIS, C. R.; LOPES, F. M. R.; GONÇALVES, D. D.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in caprines from Pitanga City, Paraná State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 358-363, 2007.

REMINGTON, J.S., McLEOD, R., THULLIEZ, P., DESMONTS, G.Toxoplasmosis. In:REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O., WILSON, C.B., BAKER, C.J. (Eds.), **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 947–1091, 2006.

RENOULT, E.; GEORGES, E.; BIAVA, M.F.; HULIM, C.; FRIMAT, L.; KESSLER, K. Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: reports of six cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 625-634, 1997.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. ; OGAWA, L.; DE PAULA, V. S. O. ; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. **Veterinary Science**, v. 82, p. 202–207, 2007.

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

RUÍZ, A.I.; CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O. Patología en pollos inoculados oralmente con diferentes concentraciones de ooquistes de *Toxoplasma gondii.* **Parasitologia Latinoamericana**. n. 60, p. 43 - 47, 2005.

SABIN, A. Zoological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin**. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v. 41, p. 75-80, 1939.

SHAAPAN, R. M., EL-NAWAWI F.A., TAWFIK M.A., Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of Toxoplasma gondii infection in naturally infected sheep. Veterinary Parasitology, v. 153, p. 359-362, 2008.

SILVA, A. V.; CUTOLO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos *anti-Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos**. Arquivo do Instituto Biológico**, v.69, p.7-11, 2002.

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

SINGH, B., Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 1135-1145, 1997.

SPALDING S.M. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **Jornal Brasileiro Patologia Medicina Laboratorial.** 105-110, 2002.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parasita dei conigli: incontrato nell lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uommo. **Revista Sociedade Science.** v. 3, p. 109-112, 1908.

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

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

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

TILAHUN, G.; TIAO, N.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; OLIVEIRA, S.; VERMA, S. K.; KWOK, O. C. H.; MOLLA, B.; SAVILLE, W. J. A.; MEDHIN, G.; KASSA, T.; ALEME, H.; GEBREYES, W. A.; SU, C.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* from Free-Range Chickens (Gallus domesticus) from Addis Ababa, Ethiopia. **J. Parasitol.** n. 99, v.4, p. 740–741, 2013.

TSUTSUI, V.S.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; FREITAS, J.C.; PRUDENCIO, L.B.; DELBEM, A.C.B.; MARANA, E.R.M. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná. **Archives of Veterinary Science.** v. 8, n. 2, p. 27-34, 2003.

VIDOTTO, O.; COSTA, A.J.; BALARIN, M.R.S.; ROCHA, M.A. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I. Observações Clínicas e Hematológicas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. n. 39, v.4, p. 623-639. 1987.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R.;FREIRE, R.L. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da Região de Londrina- Pr. **Semina**, Londrina, v.11, n.1, p.53-59, 1990.

VITALIANO, S. N. **Infecção experimental em carcarás (Caracara plancus, Miller, J. F., 1777) com *Toxoplasma gondii* (amostra ME49).** 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007. 65p.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. **Bulletin of the World Health Organization**, v.53, p.55-65, 1976.

WEISSMANN, J. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. **Canadian Veterinary Journal**, v.44, p.322-324, 2003.

WONG, S.Y.; REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii***. Aids** v. 07, p. 299-316, 1993.

XAVIER G.A., CADEMARTORI B.G., CUNHA FILHO N.A., FARIAS N.A.. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in the south of Brazil**. Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**. Jan-Feb;55(1):25-30, 2013.

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

YAP, G.S.; SHER, A. Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, Regulation and Effector Function. **Immunobiology**. v. 201, p. 240-247, 1999.

ZHU, J.; YIN, J.; XIAO, Y.; JIANG, N.; ANKARLEV, J.; LINDH, J.; CHEN, Q. A sero-epidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. **Veterinary Parasitology**. n. 158, p.360–363, 2008.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar diferentes técnicas de diagnóstico indireto e direto para detectar anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e o agente, respectivamente, em galinhas criadas no sistema colonial.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade, a especificidade e a concordância das técnicas sorológicas RIFI, MAT e ELISA na detecção de anticorpos contra *T. gondii* em galinhas.

- Avaliar a sensibilidade, a especificidade e a concordância com diferentes marcadores de PCR na detecção do DNA do *T. gondii* no sangue e nos tecidos de galinhas.

4 ARTIGO - *Toxoplasma gondii*: comparação das técnicas de diagnóstico direto e indireto em galinhas caipiras

4.1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes técnicas de diagnóstico indireto e direto para detectar *Toxoplasma gondii* em frangos caipiras. Amostras de 386 galinhas obtidas de 24 propriedades do Paraná foram utilizadas para análises sorológicas e as técnicas de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação modificada (MAT) e ensaio imunoenzimático (ELISA) foram utilizadas para detectar anticorpos contra *T. gondii*. Os animais que foram considerados positivos (119/386) em pelo menos um dos testes (RIFI, MAT e ELISA), tiveram cérebro e um conjunto de tecidos (coração, cérebro, pulmão e fígado) submetidos ao bioensaio em camundongos. As amostras de sangue total, de tecidos (coração, cérebro, pulmão e fígado), bem como o material da digestão péptica das galinhas que foram positivas e isoladas no bioensaio (18/38), foram submetidos à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para avaliar a comparação de positividade dos marcadores PCR-529pb convencional, ITS1 *Nested*-PCR, e qPCR-529pb. Cento e dezenove aves (30,8%) foram positivas em pelo menos uma das provas sorológicas, sendo 102 (26,4%) na RIFI, 64 (16,6%) no MAT, e 62 (16,0%) no ELISA. Nos testes de PCR, o marcador 529pb detectou o DNA do *T. gondii* em 30% (27/90), no ITS1 38,8% (35/90) e na qPCR 40,0% (36/90) das amostras. A RIFI foi utilizada como padrão ouro, sendo o MAT apresentou maior sensibilidade (46,0%) e especificidade (94,0) em comparação ao ELISA. A realização das provas sorológicas em paralelo demonstrou ser uma boa opção de triagem para o isolamento de *T. gondii* em tecidos de galinhas. Como padrão ouro o qPCR-529pb, a sensibilidade foi maior em ITS1 *Nested*-PCR, 69,4% e especificidade em PCR-529pb convencional 90,7%. O MAT e o ELISA tiveram similaridade nas análises de concordância. Dos 18 isolados o órgão que obteve maior positividade foi o coração, seguido do cérebro.

Palavras-chave: Toxoplasmose, sorologia, molecular, aves, coração.

Toxoplasma gondii: comparison of direct and indirect diagnostic techniques in chicken

4.2 ABSTRACT

The present work had the objective of comparing different indirect and direct diagnostic techniques to detect Toxoplasma gondii in broiler chickens. Samples of 386 chickens obtained from 24 Paraná properties were used for serological analysis and indirect immunofluorescence (IFAT), modified agglutination (MAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect antibodies against T. gondii. Animals that were considered positive (119/386) in at least one of the tests (RIFI, MAT and ELISA) had brain and a set of tissues (heart, brain, lung and liver) submitted to the bioassay in mice. Samples of whole blood, tissues (heart, brain, lung and liver) as well as peptic digestion material from chickens that were positive and isolated in the bioassay (18/38) were subjected to polymerase chain reaction (PCR) to evaluate the positivity comparison of the conventional PCR-529pb, ITS1 Nested-PCR, and qPCR-529pb markers. One hundred and nineteen birds (30.8%) were positive in at least one of the serological tests, being 102 (26.4%) in the IFAT, 64 (16.6%) in the MAT, and 62 (16.0%) in the ELISA. In the PCR tests, the 529bp marker detected the T. gondii DNA in 30% (27/90), in ITS1 38.8% (35/90) and in the qPCR 40.0% (36/90) of the samples. The RIFI was used as a gold standard, and the MAT showed higher sensitivity (46.0%) and specificity (94.0) compared to ELISA. Serological tests in parallel have been shown to be a good screening option for the isolation of T. gondii in chick tissues. As the gold standard qPCR-529pb, the sensitivity was higher in ITS1 Nested-PCR, 69.4% and specificity in conventional PCR-529bp 90.7%. MAT and ELISA had similarity in concordance analyzes. Of the 18 isolates, the organ that obtained the highest positivity was the heart, followed by the brain.

Key words: Toxoplasmosis, serology, molecular, birds, heart.

4.3 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório que infecta animais de sangue quente e causa uma infecção comum em seres humanos e em animais (DUBEY, 1986; DUBEY e BEATTIE, 1988, DUBEY, 2009). Os animais e o homem são infectados por *T. gondii* pela ingestão de oocistos no solo ou na água que foram contaminados com fezes de gato, ou pela ingestão cistos teciduais em carne mal cozida, além da transmissão congênita (DUBEY e BEATTIE, 1988). As consequências clínicas da infecção por *T. gondii* dependem de fatores ligados ao hospedeiro, como a suscetibilidade á infecção e estado imunológico, e a fatores ligados ao parasito, como a dose infectante, a via de infecção, a forma parasitária e o genótipo (DUBEY et al., 2002).

As galinhas são resistentes á infecção e não apresentam sinais clínicos de infecção por *T. gondii* (KANETO et al., 1997), sendo consideradas importantes hospedeiros intermediários, assim como os roedores, uma vez que servem como fonte de infecção do parasito para felinos. Além disso, a ingestão de seus tecidos infectados por gatos causa grande contaminação do ambiente devido à eliminação de oocistos pelas fezes. As galinhas, devido ao hábito de se alimentarem no chão, têm sido consideradas um excelente indicador da contaminação do solo por oocistos, desenvolvendo um papel muito importante na epidemiologia da toxoplasmose (DUBEY, 2002; DUBEY 2010).

Em aves, o diagnóstico da infecção por *T. gondii* pode ser feito por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), de exames sorológicos e do bioensaio (DUBEY, 2010; HOLSBACK, 2012). Dubey et al. (1993), estudando o *T. gondii* por meio de inoculações experimentais em galinhas, confirmaram que esses animais podem desenvolver anticorpos contra o parasito, bem como exibir cistos teciduais em cérebro, coração e musculatura. Os tecidos de galinhas (coração, cérebro e músculos) contendo cistos de *T. gondii* são capazes de infectar camundongos e gatos (DUBEY et al., 2003b; 2007; DUBEY, 2010; HOLSBACK, 2012).

O objetivo do presente estudo foi comparar diferentes técnicas de diagnóstico direto e indireto para detectar *T. gondii* em galinhas coloniais caipiras.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de ética no uso de animais

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA / UEL N. 64/2010).

Área de atuação

O estudo foi realizado em 24 pequenas propriedades rurais que desenvolvem a avicultura no sistema de criação colonial cujos proprietários concordaram em participar da pesquisa. As propriedades eram oriundas de 11 municípios do norte do estado do Paraná (Apucarana, Barra do Jacaré, Conselheiro Mairinck, Cornélio Procópio, Ibaiti, Jacarezinho, Pitangueiras, Santa Mariana, Santo Antônio da Platina, Siqueira Campos e Wenceslau Braz) (Figura 1).

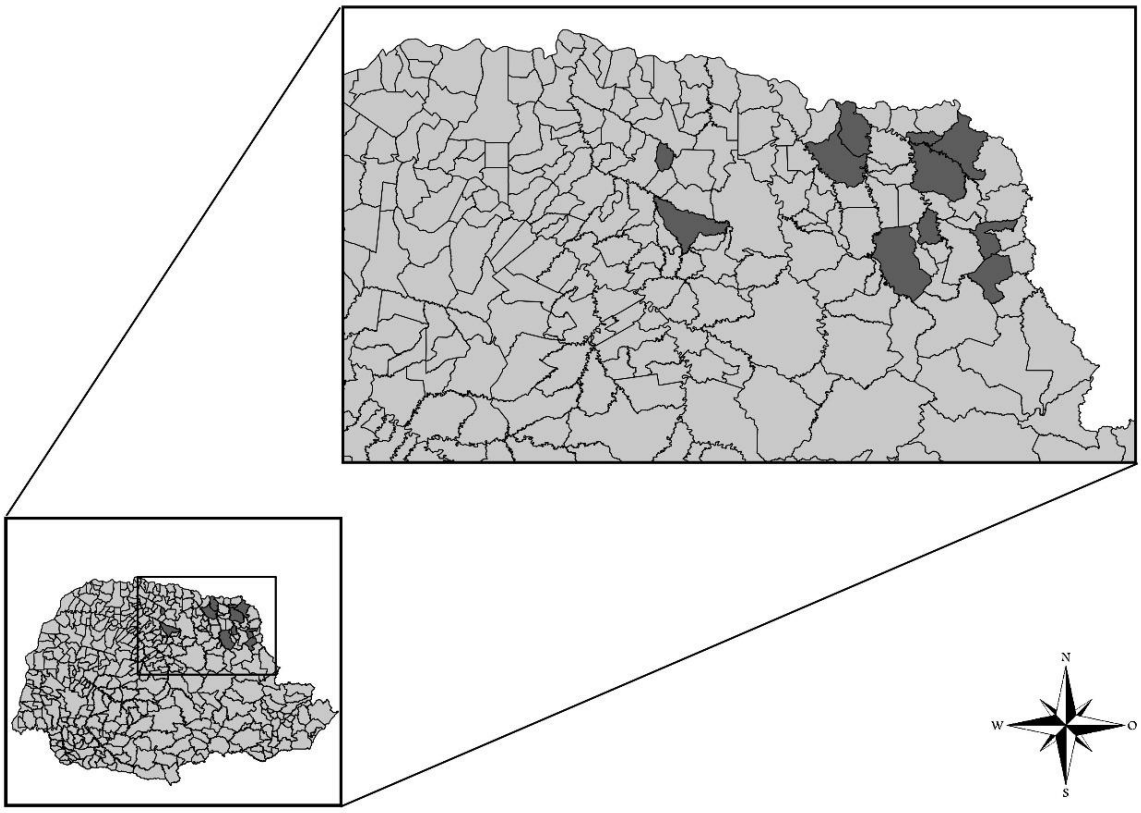

Figura 1 – Localização das propriedades na Região Norte do Estado do Paraná.

Calculo da amostra

O tamanho da amostra foi calculado assumindo uma prevalência de 50% com um nível de confiança de 95% e um erro de 5% utilizando um pacote estatístico Epi Info 3.5.4. (CDC- Atlanta).

Coleta de material

Foram coletadas amostras de sangue e tecidos (cérebro, coração, pulmão, fígado) de 386 galinhas de vida livre entre agosto de 2011 a fevereiro de 2014. Estes tecidos e sangue foram transportados em isopor com gelo ao laboratório.

Provas sorológicas

RIFI e MAT

A presença de anticorpos IgY anti-*T. gondii* foi avaliada pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI) e teste de aglutinação modificado (MAT) de acordo com as técnicas descritas por Camargo (1974) e Desmonts; Remington (1980), respectivamente. Os animais com títulos ≥ 16 foram considerados positivos em ambos os testes (Casartelli-Alves et al., 2014). Um animal considerado positivo em pelo menos um dos testes de triagem (MAT ou RIFI) teve os tecidos armazenados a 4° C por no máximo sete dias e posteriormente submetidos ao bioensaio em camundongos.

ELISA

Todas as amostras de soro das aves foram testadas pelo ELISA de acordo com a metodologia previamente descrita (GARCIA et al., 2007; ZULPO et al., 2012), com algumas modificações. O antígeno bruto de *T. gondii* foi usado para revestir as microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo plano (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Dinamarca) com 0,1 mL dos antígenos (5 µg/mL) diluídos em tampão de carbonato 0,1 M (pH 9,6) por incubação overnight a 6ºC. As placas

foram enxaguadas três vezes com PBS-tween 20 (Tris 50 mM, pH 7,4, contendo cloreto de sódio 150 mM e 0,05% tween 20) e os locais imunes não específicos foram bloqueados por incubação durante 1 h a 37 ° C com tampão de carbonato e 8 % leite em pó desnatado molico. Os soros controle e amostras foram diluídos (1: 200) em PBS-tween 20 e 5% de leite em pó desnatado, 0,1 mL desta mistura foi adicionada aos poços das microplacas em duplicata. Após o enxágue, o conjugado para a detecção de IgY (anti-IgG anti-chicken HRP, Sigma) foi diluído 1: 25 000 em PBS-tween 20 e 5% de leite desnatado e 0,1 mL da solução adicionada em cada poço e incubados por 1 h a 37º C. Após o enxágüe, a atividade da peroxidase foi revelada pela adição de 0,1 mL de solução única de Tetramethylbenzidine (TMB) Life Technologies, e a reação foi interrompida adicionando 0,05 mL de HCL 1 N. A densidade óptica (DO) foi lida a 450 nM em um leitor de microplacas ELISA. Para controles, foram incluídos soros de controle positivos e negativos em cada placa e um valor de OD corrigido foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Garcia et al. (2007). As amostras foram consideras positivas quando DO> [DO media (dos controles negativos) + 2*desvio padrão (dos controles negativos de todas as placas)].

Bioensaio em camundongos

Foram utilizados cérebro, coração, pulmão e fígado das 119 aves com reação positiva em pelo menos uma das provas sorológicas (RIFI e MAT) com objetivo de isolar o agente em camundongos de acordo com metodologia descrita anteriormente (DUBEY, 1998). As amostras de tecido foram processadas e inoculadas em camundongos albinos fêmeas, para se verificar biologicamente a presença do parasito nos órgãos e líquidos.

As amostras de cérebro foram maceradas em uma solução salina (NaCl 0,14 M) contendo antibiótico (1000 UI de penicilina e 100 µg de estreptomicina / mL), filtrada através de duas camadas de gaze esterilizadas e posteriormente inoculados via subcutânea em camundongos. O *pool* de tecidos (coração, pulmão e fígado) foi triturado utilizando um mixer, em solução salina, adicionado a um suco digestivo artificial (0,26 g de pepsina, 0,5 g de NaCl, 0,7 mL de HCl e 50 mL de água destilada q.s.p.) e incubado a 37ºC sob agitação. O homogeneizado foi filtrado e centrifugado a 1200x *g* durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o

sedimento foi neutralizado com solução de bicarbonato de sódio (1,2%, pH 8,3). A solução foi ressuspensa em solução salina e centrifugada novamente, nas mesmas condições anteriores. Depois, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi suspenso em solução salina com antibiótico, sendo posteriormente inoculado via subcutânea em camundongos. Para cada amostra de cérebro, dois camundongos foram inoculados, enquanto que para o grupo de tecido, foram inoculados três camundongos (1 ml por animal).

Os camundongos inoculados foram observados diariamente para os sinais de infecção por *T. gondii* (pêlos eriçados, lacrimejamento, emagrecimento, diarreia, distensão abdominal e prostração). Todos os camundongos com sinais de infecção ou que sobreviveram após seis semanas após a inoculação foram submetidos à eutanásia para observação da presença de taquizoítos de *T. gondii* em líquido peritoneal, cistos no cérebro e anticorpos no sangue.

Para verificar a presença de anticorpos anti *T. gondii* nos camundongos, foi utilizada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (CAMARGO, 1974). O bioensaio foi considerado positivo quando o resultado do teste apresentou título maior ou igual a 16 (TSUTSUI et al., 2007).

Extração de DNA

Para extração de DNA, foram utilizadas somente amostras de tecidos e sangue das 18 aves que tiveram amostras de *T. gondii* isoladas no bioensaio em camundongos. Foram utilizados os seguintes órgãos: coração, pulmão, cérebro e fígado, além destes, o sangue total e o material final da digestão péptica também foram utilizados para avaliar a presença de DNA do parasito. A extração de DNA foi realizada utilizando um kit comercial (PureLink ™ genomic DNA kit, Invitrogen®, USA) para as amostras de tecidos e para as amostras de sangue o kit BIOPUR kit extração mini spin plus, de acordo com as informações dos fabricantes. O DNA foi eluído em um volume final de 50µL. Também foram extraídos cepa de RH para controles positivos nas reações de PCR.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

ITS1 (*Nested*-PCR)

Esta PCR visa a região espaçadora transcrita interna do rRNA 18S-5.8S multicópia (ITS1) do parasita. Primers e metodologia foram adaptados de Buxton et al. (2001) e Hurtado et al. (2001) (Tabela 1). Para melhorar a sensibilidade da técnica, cada reação foi realizada em triplicata. As condições de termociclagem da primeira reação utilizando os iniciadores NN1_F e NN2_R, foram de 5 min a 95° C, seguidas de 35 ciclos de 1 min a 95° C, 1 min a 55° C, 1 min a 72° C e um período de extensão final de 5 min a 72° C. Para reduzir os primers não utilizados da PCR primária, os produtos de PCR de primeira reação foram diluídos em 1: 5 com H_2O destilada. As condições para a segunda reação foram idênticas às primeiras, exceto 2 µl de produto diluído da primeira rodada, em vez de DNA, e foram utilizados 5 µM de iniciadores NP-1_F e NP-2_R (Hurtado et al., 2001) (Tabela 1). Um controle positivo constituído de DNA extraído da cepa RH e um negativo, água ultrapura estéril foram incluídos. Todos os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, incorporando Biotum Gel Red ™ (Cambridge Bioscience Ltd, Cambridge, Reino Unido).

529 pb (PCR convencional)

Para amplificação do fragmento 529pb de *T. gondii* foram utilizados os primers Tox4 e Tox5 segundo Homan et al., (2000) (Tabela1). As condições de PCR foram realizadas como descrito por Garcia et al. (2006). Resumidamente, uma mistura contendo DNA extraído mais uma mistura de 1,0 mM de cada iniciador, 100 mM de cada DNTP (Invitrogen, Life Technologies, EUA), Tris-HCl 60 mM (pH 9,0), 15 mM, MgCl2 2 mM, e 0,5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, EUA). A amplificação do DNA do parasita foi realizada ao longo de 35 ciclos em termociclador (Veriti, Applied Biosystems, EUA), utilizando as seguintes condições de termociclagem: 5 min a 94° C para desnaturação no primeiro ciclo, seguido de 33 ciclos durante 1 min a 94° C para desnaturação, 1 min a 55° C para anelamento e 1 min a 72° C para extensão, e um ciclo final de 10 min a 72° C. As alíquotas de cada PCR foram submetidas a eletroforese em 1,5% de gel de agarose. Um controle

positivo constituído de DNA extraído da cepa RH e um negativo, água ultrapura estéril foram incluídos em cada teste de PCR.

qPCR-529pb

A amplificação da qPCR foi realizada utilizando o sistema de PCR em tempo real StepOne ™ Plus (Life Technologies, EUA) e o sistema Taqman (Life Technologies, EUA) seguindo a metodologia descrita por Opsteegh et al (2010) (Tabela 1). Os iniciadores específicos Tox9F e Tox11R foram utilizados para amplificar um produto de 162 pb da região do 529pb conforme descrito anteriormente (Reischl et al., 2003). Para cada amostra, a mistura de PCR continha 12,5 µL de TaqMan®Universal PCR MasterMix (Life Technologies, EUA), 0,7 µM de cada iniciador, 0,05 µM de Sonda, BSA (10 µg / ml), 2 µL de DNA e água ultrapura em uma solução final de 25µL. Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata e realizadas da seguinte forma: desnaturação inicial a 95° C durante 10 minutos, 45 ciclos a 95° C durante 10 s, 58° C durante 20 s e 72° C durante 20 s. A fluorescência foi medida no final de cada ciclo. Para a quantificação da quantidade de DNA de *T. gondii* nas amostras, uma curva padrão foi construída com base na concentração de taquizoítos da cepa RH variando de 2,61x 10^7 à 2,61x 10^3 taquizoítos por mL.

Tabela 1- Primers utilizados nas diferentes técnicas de PCR.

Marcador	Primers (5'- 3')	Referência
ITS1	NN1 _F – CCT TTG AAT CCC AAG CAA AAC ATG AG NN2_R – GCG AGC CAA GAC ATC CAT TGC TGA NP1_F – GTG ATA GTA TCG AAA GGT AT NP2_R – ACT CTC TCT CAA ATG TTC CT	Buxton et al. (2001); Hurtado et al. (2001)
529pb	TOX4_F- CGC TGC AGG GAG GAA GAC GAA AGT TG TOX5_R – CGC TGC AGA CAC AGT GCA TCT GGA TT	Homan et al., (2000)
qPCR- 529pb	TOX9_F - AGG AGA GAT ATC AGG ACT GTA G TOX11_R - GCG TCG TCT CGT CTA GAT CG	Reischl et al., (2003)

Análise estatística

Para avaliar a concordância entre os testes sorológicos e moleculares, foi utilizado o índice *kappa*. A sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos e moleculares foram estimadas utilizando a RIFI e a qPCR-529pb como prova padrão ouro. Para a interpretação dos valores de *kappa* utilizou-se a caracterização em faixas de valores segundo Landis e Koch (1977). Os dados estatísticos foram avaliados através do Openepi (http://www.openepi.com/DiagnosticTest.htm).

4. 5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Das 386 amostras de galinhas utilizadas no estudo, 119 amostras (30,8%) foram consideradas positivas em pelo menos um dos testes sorológicos (RIFI, MAT e ELISA). Destas, 102 (26,4%) amostras foram positivas na RIFI, 64 (16,5%) no MAT e 62 (16,0%) no ELISA (Tabela 2). Utilizando como padrão ouro a RIFI, o MAT apresentou sensibilidade e especificidade levemente maior comparado ao ELISA (MAT= 46,0%; 94,0% e ELISA= 43,5%; 93,6%). Casartelli-Alves et al. (2014) avaliaram também essas provas sorológicas, porém usando bioensaio como padrão ouro e encontraram as sensibilidades e especificidades parecidas com o presente estudo: 85% e 56%, respectivamente, para o ELISA e 76% e 68%, respectivamente, para o MAT.

Tabela 2. Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice *Kappa* da RIFI, MAT e ELISA utilizando como padrão ouro a RIFI.

		RIFI			IC= 95%				
					SE	EP	VPP (%)	VPN (%)	*KAPPA*
		+	-	**Total**					
MAT	+	47	17	64 (**16,5**%)	46,0	94,0	73,4	82,9	**0.45**
	-	55	267	322					
	Total	102(**26,4**%)	284	**386(100%)**					
ELISA	+	44	18	62(**16,0**%)	43,5	93,6	70,9	82,4	**0.42**
	-	58	266	324					
	Total	102(**26,4**%)	284	**386(100%)**					

SE - Sensibilidade; EP - Especificidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; *KAPPA* – índice de concordância

Em um estudo com suínos infectados por *T. gondii*, a sensibilidade e especificidade de vários testes sorológicos como teste de aglutinação modificada (MAT), teste de aglutinação de látex (TAL), teste de hemaglutinação indireta e o ELISA foram comparados para a detecção de anticorpos co*ntra T. gondii,* sendo o MAT considerado o mais específico e sensível (DUBEY et al., 1995). Em outro estudo com suínos experimentalmente infectados a avaliação entre as técnicas RIFI e MAT mostrou uma excelente concordância entre as técnicas, e o valor de *kappa* foi considerado excelente (k= 0,86) (MINHO et al., 2004). No presente estudo, o valor de *Kappa*, quando comparou-se MAT e a RIFI como padrão ouro foi considerado moderado (*k*=0,45), essa semelhança na concordância kappa (k=0,42) também foi observada por Reis et al., (2007) em soros de caprinos.

Em ovinos, Klun et al. (2007) obtiveram uma concordância de *kappa* moderada (*k*= 0,46 e 0,51), quando comparam o MAT ao ELISA, semelhante ao presente estudo.

Foi verificado que a triagem com a RIFI e MAT em paralelo, aumenta a taxa de isolamento pelo bioensaio do agente, apesar de que a RIFI se mostrou mais efetiva que o MAT no diagnóstico da toxoplasmose em frangos caipiras. Porem, Dubey (2010) e Casartelli-Alves et al. (2014) recomendam o MAT como técnica de eleição para o diagnóstico de *T. gondii* em galinhas. Em ovinos, Seefeldt et al. (1989) citaram o MAT como prova de escolha frente ao ELISA e à RIFI para o diagnóstico de anticorpos anti-*T. gondii*.

O MAT e o ELISA tiveram uma pequena diferença no diagnóstico neste estudo, apesar de alguns autores relatarem o MAT como prova de escolha, devido à algumas vantagens como a praticidade, a viabilidade para testar pequeno número de amostras, a facilidade de leitura sem necessidade de instrumentos especiais, diferente do que ocorre com a RIFI e no ELISA, que necessitam de conjugados espécie especificas.

Das 119 amostras que foram submetidas ao bioensaio, 38 camundongos do bioensaio soroconverteram, e 18 (47,37%) tiveram cepas isoladas (Tabela 4). Destas 18 aves com isolamento três foram negativas no MAT e uma na RIFI. Das 90 amostras de DNA extraídas (sangue, coração, pulmão, cérebro, fígado e digestão) das galinhas isoladas, o marcador 529 pb, detectou o DNA do *T. gondii* em 30% (27/90) das amostras, na *Nested*-PCR ITS1 38,8% (35/90) e na qPCR 40,0% (36/90) foram positivas. A tabela 3 apresenta a sensibilidade (SE) e especificidade (EP) das PCRs utilizando o ensaio qPCR-529pb como padrão ouro. Desta forma, a *Nested*-PCR ITS1 apresentou maior sensibilidade (69,4%) e a PCR 529pb convencional a maior especificidade (90,7%). O valor do *kappa* foi considerado moderado ficando entre k=0,51 e 0,54.

Embora não tenha sido realizado bioensaio de cada órgão utilizado para extração de DNA e PCR, o que pode ter dificultado a avaliação global dos testes de PCR, observou-se uma maior positividade na qPCR-529pb 40,0% (36/90), comparada com a PCR-529pb convencional 30% (27/90) e *Nested*-PCR-ITS1 38,8% (35/90), porém os resultados individuais foram muito semelhantes.

Tabela 3. Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice *Kappa* dos marcadores de PCR utilizando como padrão o qPCR, realizado a partir do DNA das amostras de tecidos e sangue das 18 aves quais foram isoladas o *T. gondii*.

		qPCR			IC = 95%				
		+	-	**Total**	SE	EP	VPP (%)	VPN (%)	*KAPPA*
529pb	+	22	5	27 **(30,0%)**	61,1	90,7	81,4	77,7	0,54
	-	14	49	63					
	Total	36	54	90 **(100%)**					
ITS1	+	25	10	35 **(38,8%)**	69,4	81,4	71,4	80,0	0.51
Nested	-	11	44	55					
PCR	**Total**	36 **(40,0%)**	54	90 **(100%)**					

SE - Sensibilidade; EP - Especificidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; *KAPPA* – índice de concordância.

No presente estudo a *Nested*-PCR (ITS1) foram detectados mais amostras positivas do que no 529pb (8,8%). Hurtado et al. (2001) demonstraram que a *Nested*-PCR foi sensível e específica e pode ser utilizada para confirmar casos sorológicos duvidosos. Montoya et al. (2009) também obtiveram ótimos resultados ao utilizar a *Nested*-PCR descrevendo que a quantidade de DNA parasitário extraído na maioria das vezes não é suficiente para ser detectado apenas na primeira reação de PCR.

A *Nested*-PCR é mais sensível do que a PCR convencional, porém não é a preferência na rotina de diagnóstico por requerer duas etapas de amplificação de PCR. Isso torna a mão-de-obra mais cara, aumenta o risco de contaminação e também aumenta o tempo para realização (CALDERARO et al., 2006).

Os primers utilizados no estudo, NN1 e NN2, amplificam uma região do ITS1 comum a ambos *T. gondii* e *Neospora caninum*. Os primers internos Tg-NP1 e Tg-NP2 e amplificaram uma região de 227 pb do ITS1 específico de *T. gondii*, aumentando assim a especificidade.

A técnica de PCR possui uma série de fatores que podem interferir nos resultados, tais como as condições físico-químicas das reações, a concentração e a natureza do DNA alvo e os iniciadores e sondas de PCR selecionados. Bastien,

Procop e Reischl (2008) mostraram que as condições de PCR diferiram entre pesquisadores em termos da temperatura de anelamento e da composição da mistura, isto é, as concentrações de $MgCl_2$, dNTPs, Taq polimerases, iniciadores e modelos. Esses fatores podem influenciar na reação e alterar a sensibilidade do teste.

As contaminações ocorrem devido à manipulação dos amplicons formados na primeira reação PCR para a segunda reação. (HURTADO et al. 2001). A extração de DNA requer alguns cuidados e o uso de kits comerciais de extração permite uma purificação do DNA mais eficiente em relação aos métodos de extração de DNA tradicionais resultando em uma melhor qualidade do DNA extraído, não deixando resíduos de substâncias inibidoras (KALIA et al. 1999; MCORIST, JACKSON, BIRD, 2002).

No presente estudo a qPCR se mostrou mais eficaz no diagnóstico do *T. gondii*, porém com semelhança em comparação aos outros marcadores. Segundo Bastien, Procop e Reischl (2008), apesar das vantagens e o avanço na introdução da qPCR nos laboratórios, o uso da qPCR sozinha não garante excelência no diagnóstico, e nas situações que foi constatada que a qPCR foi mais sensível, deve-se considerar que foi para aquele ensaio em particular e também mencionando os métodos utilizados.

A região do genoma utilizada (529pb) em conjunto com a elevada sensibilidade do método de qPCR na detecção de um parasito por mL, repete a sensibilidade descrita por Edvinsson et al. (2006), que também utilizaram a qPCR baseada no genoma repetitivo 529pb, porém eles utilizaram o sistema de fluorescência SYBR®Green em amostras de sangue de humanos transplantados e imunocomprometidos. Jauregui et al. (2001) obtiveram a mesma sensibilidade em amostras de tecidos de suíno e camundongos, utilizando o sistema TaqMan, o mesmo utilizado no presente estudo, entretanto, utilizaram a amplificação de sequência dirigida para a região ITS1 do gene 18S rRNA.

Apesar das amostras de digestão péptica analisadas conterem coração que foi um dos órgãos com maior positividade, apenas 3/18 foram positivas *Nested*-PCR. Este resultado pode ser explicado pela possibilidade de degradação do DNA durante o processo da digestão ou por conter substâncias inibidoras da reação de PCR.

No presente trabalho foram obtidos 18 isolados, dois provenientes de cérebro, sete da digestão dos outros órgãos e nove de ambas as fontes. Este tropismo pelos músculos, em especial o cardíaco, verificado em galinhas foi descrito por Dubey (2010), que apontou a distribuição de 89,5% no coração contra 49,2% no cérebro. Portanto, indica o coração o órgão mais sensível apropriado para isolamento.

Tabela 4. Resultado das diferentes técnicas de PCR dos diferentes tecidos de galinhas isoladas de *T. gondii* no bioensaio e análise de concordância entre os marcadores moleculares.

Animal	ITS1(*Nested*)						529pb convencional						qPCR- 529pb					
	Cérebro	Pulmão	Coração	Fígado	Sangue	Digestão	Cérebro	Pulmão	Coração	Fígado	Sangue	Digestão	Cérebro	Pulmão	Coração	Fígado	Sangue	Digestão
5	-	-	+	-	NE	-	+	-	+	-	NE	-	+ 609	-	+ 2157	-	NE	-
8	+	-	+	-	NE	-	+	-	+	-	NE	-	+ 6790	-	+4450	-	NE	-
50	-	+	+	-	NE	+	-	+	+	-	NE	-	+ 1260	+746	-	-	NE	-
84	+	+	+	-	NE	+	+	+	+	-	NE	-	+ 7406	-	+14636	-	NE	-
106	+	NE	NE	-	NE	-	+	NE	NE	-	NE	-	+ 5210	NE	NE	-	NE	-
107	+	NE	NE	-	NE	-	+	NE	NE	-	NE	-	+12473	NE	NE	-	NE	-
175	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+3961	+631	-	-	+662	-
176	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+11785	+948	+470	-	+540	-
179	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+32288	-	+749	-	+948	-
202	-	NE	+	-	-	-	-	NE	+	-	-	-	+930	NE	+3318	-	-	-
240	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+14908	-	+2676	-	-	-
276	-	NE	+	-	-	-	-	NE	-	-	-	-	-	NE	+306	+521	+967	-
278	+	NE	NE	-	NE	-	+	NE	NE	-	NE	-	+3741	NE	NE	-	NE	-
279	-	NE	+	-	NE	-	-	NE	+	-	NE	-	-	NE	+4201	-	NE	-
281	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
283	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+17762	-	+2826	-	-	-
288	+	-	+	NE	-	-	+	-	+	NE	-	-	+3567	-	+157183	NE	-	-
293	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+1966	-	+3080	+1662	-	-
+/Total	11/18	5/12	15/15	1/17	0/10	3/18	13/18	3/12	11/15	0/17	0/10	0/18	15/18	3/12	12/15	2/17	4/10	0/18
+/Total	35/90						27/90						36/90					

Concordância em três marcadores

Concordância em dois marcadores

Não concordância em marcador

Não existente

*qPCR calculada a partir de uma curva padrão partindo de 2,61 x 10^7 á 2,61 x 10^3 taquizoítos por mL

5 CONCLUSÃO

A RIFI foi a técnica sorológica com maior concordância com o isolamento do parasita, embora tenha apresentado menor especificidade, apresentou maior positividade, melhorando as chances de detecção de anticorpos do parasito. O MAT e o ELISA tiveram similaridade nas análises de concordância, porém entre os três testes sorológicos testados o MAT é a técnica mais simples e com menos custo a ser realizada.

Os marcadores de PCR foram efetivos na detecção de DNA do parasita e, como descrito por outros autores, o coração é o orgão de eleição para estas avaliações, pois foi o que apresentou maior número de positivos, seguido do cérebro.

A PCR convencional baseada no marcador 529pb foi efetiva no diagnóstico molecular do parasita nas amostras analisadas, por ser um teste mais simples e de menor custo, podendo ser utilizada para diagnóstico do *T. gondii*. A qPCR e a *nested*-PCR foram mais sensiveis, porém muito similar com a PCR convencional, não apresentando bom custo benefício pois a *nested* tem maior chance de contaminação e maior tempo de trabalho e a qPCR necessita de profissionais habilitados e material de alto custo.

Os orgãos de eleição no presente estudo foram coração e cérebro, inclusive mais quantidade de parasitas. As amostras da digestão péptica submetidas as PCR demostraram menor positividade, em razão de possivelmente possuirem substância inibidoras na reação de PCR ou pela degradação do DNA durante o processo da digestão

REFERÊNCIAS

BASTIEN, P., PROCOP, G. W., & REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than " conventional" PCR. **Journal of Clinical Microbiolog***y*, *46*(6), 1897-1900., 2008.

BUXTON D., WRIGHT S., MALEY S.W., RAE A.G., LUNDÉN A. & INNES E.A. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. **Parasite Immunology**. 23:85-91, 2001.

CALDERARO A., PICCOLO G., GORRINI C., PERUZZI S., ZERBINI L., BOMMEZZADRI S., DETTORI G., CHEZZI C. Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* **Acta Biomedica Atenei Parmensis**, 77 (2), pp. 75-80, 2006.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de Imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica,** v. 10, n. 4, p. 143-171, 1974.

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

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct Agglutination Test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n.6, p. 562-568, 1980.

DUBEY, J. P Toxoplasmosis in cats. **Feline Practice**, v.16, p.12-26,1986.

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

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

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p, 2009.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. **Zoonoses Public Health**, v.57, p.60-73, 2010.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man.** CRC Press, Boca Raton, FL. p. 1–220, 1988.

DUBEY J.P., RUFF M.D., CAMARGO M.E., SHEN S.K, WILKINS G.L, KWOK O.C, THULLIEZ P.. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 10, p. 1668-1672, 1993.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; WEIGEL, R. M.; ANDREWS, C. D.; LINF, P.; POWELL, E. C. Sensitivity and specifity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. **American Journal Veterinary Research**, USA, v. 56, n. 8, p. 1030-1036, 1995.

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

EDVINSSON, B.; LAPPALAINEN, M.; EVENGÅRD, B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infection**., 2, 131-136, 2006.

FRANCO, W. A. C.; BERGAMASCHI, D. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; NOQUEIRA, Y.; CAMARGO, L. M. A.; SOLSA S, L. P.; GENNARI, S. M. Evaluation of the performance of the modified direct agglutination test (MAT) for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 452-456, 2003.

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

GARCIA J.L., GENNARI S.M., MACHADO R.Z., NAVARRO I.T. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 4, p. 267-271, 2006.

GARCIA, J.L., NAVARRO, I. T., BIAZZONO, L., FREIRE, R.L., GUIMARÃES, J.S.J., CRYSSAFIDIS, A. L., BUGNI, F.M., CUNHA, I. A.L., HAMADA, F.N., DIAS, R.C.F. Protective activity against shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by intranasal route**. Veterinary. Parasitology**., 145, pp. 197-206, 2007.

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

HOLSBACK, L; PENA, H.F.J.; RAGOZO, A.; LOPES, E.G.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.. Serologic and molecular diagnostic and bioassay in mice for detection of *Toxoplasma gondii* in free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n. 32, v. 8, p.721-726, 2012.

HURTADO A., ADURIZ G., MORENO B., BARANDIKA J. & GARCIA- -PÉREZ A.L. Single tube nested PCR for the detection of Toxoplasma gondii in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinay Parasitology**., 102:17-27, 2001.

JAUREGUI, L. H., HIGGINS J., ZARLENGA D., DUBEY J. P., LUNNEY J. K. Development of a real-time PCR assay for detection of Toxoplasma gondii in pig and mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.6, p.2065-2071, 2001.

KANETO C.N., COSTA A.J. & PAULILLO A.C. Experimental toxoplasmosis in broiler chickens. **Veterinary Parasitology**, 69:203-210, 1997.

KALIA A., RATTAN A. & CHOPRA P.A. Method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. **Analytic Biochem**., 275:1-5, 1999.

KOMPALIC-CRISTO A., BRITTO C. & FERNANDES O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**., 41:229-35, 2005.

KLUN, I.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; THULLIEZ, P. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally exposed sheep. **Zoonoses Public Health**, Washington, v. 54, n. 3/4, p. 165-168, 2007.

LANDIS, J.R. e KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p. 159-174, 1977.

MARCA, M. C.; RAMOS, J. J.; LOSTE, A.; SAEZ, T.; SANZ, M. C. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. **Veterinary Parasitology**, USA, v. 67, n. 1/2, p. 99-103, 1996.

MCORIST A.L., JACKSON M. & BIRD A.R**.** A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples.J. **Microbiology Methods**, 50:131-139, 2002.

MINHO A.P., FREIRE R.L., VIDOTTO O., GENNARI S.M., MARANA E.M., GARCIA J.L., NAVARRO I.T. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of antibodies against Toxoplasma gondii in experimentally infected pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 24(4): 199-202, 2004.

OPSTEEGH,M., LANGELAAR,M., SPRONG,H., DEN HARTOG L., DE CRAEYE, S,.BOKKEN, G., AJZENBERG, D., KIJLSTRA,A., DER GIESSEN J. V. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR**. Internacional Journal of Food Microbiology**.,139(3), pp.193-201, 2010.

MONTOYA A., MIRÓ G., MATEO M., RAMÍREZ C. & FUENTES I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**., 160:159-162, 2009.

SIQUEROLI, C. R. R. ; LOPES, F. M. R. G. ; GONCALVES, D. D. ; FREIRE, R. L. ; GARCIA, J. L. ; NAVARRO, I. T . Ocurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in caprine from Pitanga city. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 358-362, 2007.

REISCHL, U, BRETAGNE, S, KRUGER, D., ERNAULT P, COSTA, J.M. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes **BMC Infectious Diseases,** v. 3 p. 7, 2003.

SEEFELDT, S. L.; KIRKBRIDE, C. A.; DUBEY, J. P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody test, and direct agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally aborted ovine fetuses. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v. 1, n. 2, p. 124-127, 1989.

SEDLAK, K.; LITERAK, I.; VITULA, F.; BENAK, J. High susceptibility of partridges (*Perdix perdix*) to toxoplasmosis compared with other gallinaceous birds. **Avian Pathology**, v.29, p. 563-569, 2000.

SILVA, A. V.; CUTOLO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-Toxoplasma em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 7-11, 2002.

SPALDING S.M., ANGEL S.O., AMENDOEIRA M.R.R. Toxoplasmose, p.102-111. In: ROSSETTI M.L., SILVA C.M.D., RODRIGUES J.J.S. (Eds), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular, **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2006.

TSUTSUI, V.S.; FREIRE, R.L.; GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; VIEIRA, D.P.; MARANA, E.R.M.; PRUDÊNCIO, L.B.; NAVARRO*,* I.T. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. n. 59, v. 1: p. 30-34. 2007.

ZULPO, D. L.; LEITE, J. H. A. C.; CUNHA, I. A. L.; BARROS, L. D.; TARODA, A.; CAMARGO JÚNIOR, V. E.; SANTOS, H. L. E. P. L.; GARCIA, J. L. Ocorrência de anticorpos contra *Leishmania spp*., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina-Pr. **Semina**: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1897-1906, 2012

APÊNDICES

APÊNDICE A

TABELA DE VALORES DE CONCORDÂNCIA ÍNDICE KAPPA Landis e Koch, 1977.

Valor Índice *Kappa* (*K*)	Concordância
0	Pobre
0 a 0,20	Ligeira
0,21 a 0,40	Considerável
0,41 a 0,60	Moderada
0,61 a 0,80	Substancial
0,81 a 1	Excelente