



Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas

Itainá Paixão dos Santos

**Detecção de anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* em
ovinos utilizados em sistema de produção semi-intensivo**

Cruz das Almas

2010

Itainá Paixão dos Santos

Detecção de anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* em ovinos utilizados em sistema de produção semi-intensivo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito da disciplina CCA: 335 Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária.

Ficha Catalográfica

S237 Santos, Itainá Paixão dos.

Detecção de anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* em ovinos utilizados em sistema de produção semi – intensivo. / Itainá Paixão dos Santos. – Cruz das Almas - BA, 2010.

50f.; il.

Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

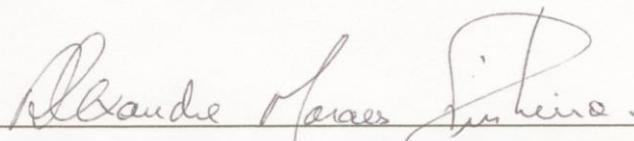
1.Ovinos – Produção. 2.Parasitologia veterinária. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.39

Itainá Paixão dos Santos

**Detecção de anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* em
ovinos utilizados em sistema de produção semi -
intensivo**

Aprovado em: 14/12/2010



Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro (Orientador)



Prof. Dr. Jair de Araújo Marques

Prof.^a Larissa Pires Barbosa

Cruz das Almas

2010

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha avó Zizi que com todo o seu amor e alegria sempre esteve presente em minha vida.

Agradecimentos

À Deus que me deu a oportunidade de viver e realizar este trabalho, sempre esteve ao meu lado quando me senti incapaz, me fortificando todas as vezes que me senti fraca diante das dificuldades.

Aos meus pais Lia e Germinio por acreditarem que a educação é a maior herança que se deixa para um filho. Seu amor, conselhos e apoio incondicional me trouxeram até aqui e vão me conduzir por toda a minha vida. Obrigada por tudo a conclusão deste trabalho é o resultado de toda a sua dedicação.

Às minhas irmãs Itaiane e Taise por estarem ao meu lado, por fazerem parte da minha vida.

À toda família Paixão vocês são o maior exemplo de amor, união, alegria, respeito e caráter.

A toda a turma de Biologia 2006.2 e 2007.1 pela companhia, amizade e carinho que me dedicaram todo este tempo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro, pela coragem e paciência de orientar esta aluna tão “ocupada”. Meus sinceros agradecimentos sua segurança, dedicação e competência são um exemplo para mim.

À Prof. Dr. Larissa Pires por gentilmente ceder às amostras de soros.

À Ligia Lins pela valiosa ajuda e disponibilidade para a realização dos testes.

À todos os professores e funcionários pelos ensinamentos e competência que sempre foram presentes em todos os dias dedicados a realização deste curso.

Quando a sabedoria entrar no teu coração e o próprio conhecimento se tornar agradável à tua própria alma, guarda-te o próprio raciocínio resguarda-te o próprio discernimento, para livrar-te do mau caminho.

Provérbios 2:10

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário Apicomplexa da família Sarcocystidae. Apresenta como hospedeiros definitivos os membros da família Felidae, enquanto que aves e mamíferos, incluindo o homem, são hospedeiros intermediários. O *T. gondii* é um importante patógeno de ovinos, sendo observado desde 1942 em tecidos oriundos de restos de abortos. Em virtude disto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a frequência dos anticorpos IgG anti *T. gondii* em ovinos utilizados em sistema de produção semi-intensivo e com reprodução assistida. Foram utilizados soros de 113 ovelhas da raça Santa Inês (79 multíparas e 34 nulíparas), dois cães e um gato, de uma propriedade com sistema de produção semi-intensivo e programa de reprodução assistida no município de Entre Rios – Bahia. Os soros foram submetidos ao teste de hemaglutinação indireta (HAI) para detecção de anticorpos IgG anti- *T. gondii* . As amostras de soro foram triadas numa diluição de 1:64. Aquelas com reação positiva, neste ponto de corte, foram novamente diluídas em série, numa razão de dois, até não mais reagirem, para a determinação dos seus títulos. Das 113 amostras de ovelhas analisadas seis (5,30%) foram positivas no teste de hemaglutinação indireta. Todas as ovelhas positivas eram multíparas. Duas amostras foram positivas no ponto de corte de 1:64, duas amostras apresentaram títulos de 1:128 e duas de 1:256. Apenas um cão foi positivo apresentando título de 1:128. O gato testado não apresentou reação no teste estudado. Os resultados nos levam a concluir que 5,30% das ovelhas da propriedade estudada apresentam anticorpos anti - *T. gondii* Indicando que o parasito pode estar presente em propriedades que utilizam sistema de produção semi-intensivo e com programa de reprodução assistida.

Palavras-chave: Toxoplasmose, sorologia, hemaglutinação.

Abstract

Toxoplasma gondii is a Apicomplexa protozoan that family Sarcocystidae. Presentes a definitive hosts the Felidae family members, and birds mammals as intermediate hosts. *T.gondii* is an important pathogen of sheep, being observed abortious in tissues since 1942. The of this study was IgG antibodies frequency against *T. gondii* in sheep kep in a reproduction program. We used sera from 113 Santa Inês bred sheeps (79 multiparous and 34 nuliparous), two dogs and a cat, in a property with semi-intensive production system in the city of Entre Rios – Bahia. Sera were tested using the indirect hemagglutination test (IHA) to detection of IgG antibodies of *T.gondii*. Serum samples were screened at a dilution of 1:64 and. Those with positive reaction, were diluted in serially (ratio of two), until there is no more reaction. Six samples (5.30%) were positive by indirect hemagglutination test. Two samples were positive at 1:64, two samples at of 1:128 and more two in of 1:256. All sheep were positive multiparous. Only one dog was positive at titers of 1:128. The cat tested show no reaction in the test. The results lead us to conclude that 5.30% of the sheep have antibodies IgG anti *T.gondii* in the study conditions. This indicat that the parasite may be present on farms that use semi intensive production system and reproduction programs.

Keywords: Toxoplasmosis, serology, hemagglutination.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ELISA	Ensaio Imunoenzimático
HAI	Hemaglutinação Indireta
IFI / IFAT	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEIA	Ensaio Imunoenzimático de Micropartículas
NK	Natural Killer
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PVM	Membrana do Vacúolo Parasitóforo
ROP	Proteína da Róptria

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Esquema representativo da estrutura do *Toxoplasma gondii*.....10

Figura 2: Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*.....14

Tabela 1- Detecção de anticorpos IgG anti *T. gondii* em ovelhas nulíparas e múltiparas numa propriedade com sistema de criação semi intensivo e programa de reprodução assistida..... 26

Tabela 2: Distribuição dos ovelhas positivos de acordo com o título de anticorpos IgG anti *T. gondii*.....27

Sumário

Folha de Rosto.....	ii
Folha de Aprovação.....	iii
Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Epígrafe.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	ix
Lista de Figuras e Tabelas.....	x
1.0. Introdução.....	09
2.0. Revisão de Literatura.....	10
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	10
2.2. Ciclo Biológico.....	12
2.3. Transmissão.....	14
2.4. Invasão da Celular.....	15
2.5. Patologia.....	16
2.5.1. Toxoplasmose em ovinos.....	18
2.6. Resposta Imunológica.....	19
2.7. Diagnóstico.....	20
3.0 Objetivos.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4.0. Material e Métodos.....	23
4.1. Amostras.....	23
4.2. Realização dos testes de Hemaglutinação Indireta.....	23
5.0. Resultados.....	24
6.0. Discussão.....	25

7.0. Conclusão.....	27
8.0. Referências Bibliográficas.....	28

1.0. Introdução

O *Toxoplasma gondii* é um importante agente em infecções reprodutivas. É um coccídeo intestinal dos Felídeos (hospedeiros definitivos) com uma série de hospedeiros intermediários como aves e mamíferos.

A toxoplasmose é um problema de sanidade na ovinocultura, desde 1942 o parasito é descrito como causador de abortos em ovinos, sendo considerado como a maior causa de problemas reprodutivos na espécie.

O Brasil é considerado o oitavo produtor mundial de ovinos e caprinos com um rebanho de aproximadamente 32 milhões de cabeças, dos quais 63% são de ovinos. A região nordeste possui o maior rebanho ovino do Brasil, com 7,2 milhões de cabeças, 39% do rebanho nacional (MAPA, 2005).

O Estado da Bahia conta com a segunda maior população ovina do Brasil, entretanto os sistemas de criação são caracterizados por baixos índices de produtividade e problemas sanitários. No Nordeste, o sistema de produção predominante de ovinos é o extensivo, composto por animais de corte com produção voltada à subsistência. Neste sistema os animais são criados em grandes extensões de terra com água e pasto naturais. No sistema semi-intensivo os animais são recolhidos à noite e recebem algum tipo de suplementação alimentar e controle sanitário.

A toxoplasmose é uma importante zoonose que causa problemas reprodutivos e perdas econômicas. Além disso, o consumo de carne ovina crua ou mal cozida, contendo cistos do *T. gondii*, representa um grave problema de saúde pública. Em humanos geralmente é assintomática, entretanto, os pacientes imunodeprimidos podem apresentar manifestações clínicas ou neuropsiquiátricas. As mulheres infectadas antes da gestação não transmitem a infecção para o feto, entretanto, quando a toxoplasmose é adquirida durante a gravidez, dependendo do período gestacional, pode causar aborto.

Em resposta à infecção do *T.gondii* são produzidos anticorpos anti- *T. gondii*, anticorpos IgM são indicativos de infecção recente, enquanto que os anticorpos IgG surgem com a maturação da resposta imune.

A pesquisa de anticorpos IgG pelo método de hemaglutinação indireta em análises sorológicas tem sido utilizada para o diagnóstico de toxoplasmose. Este

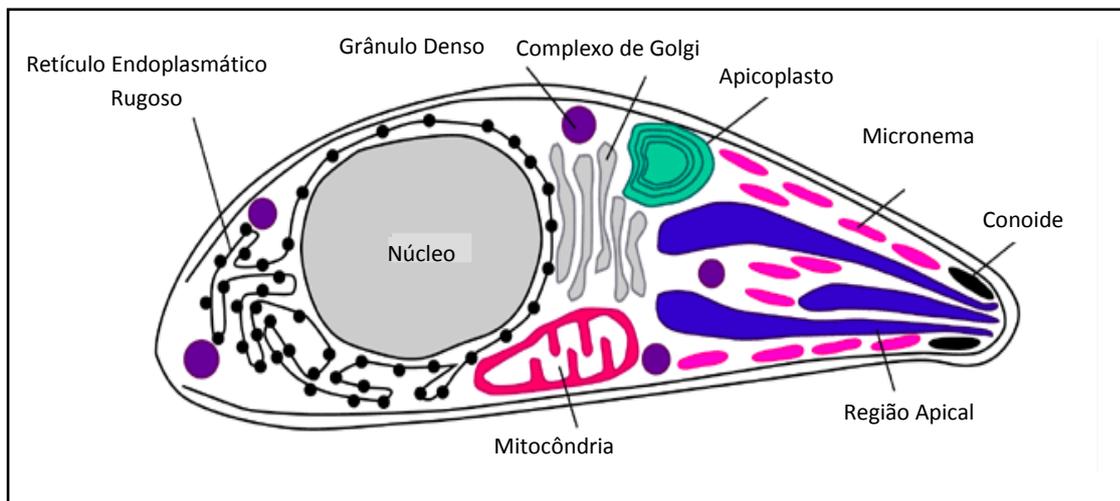
teste apresenta grande utilidade devido a sua facilidade de realização, triagem satisfatória e baixo custo.

Diante disso, o estudo da presença do *T. gondii* em ovinos numa propriedade com sistema de criação semi-intensivo e com utilização de programa de reprodução assistida, no município de Entre Rios representa uma importante fonte de informação para a epidemiologia da doença e para a produção de ovinos no Estado da Bahia.

2.0. Revisão de Literatura

2.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário do Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae; Gênero *Toxoplasma*, Espécie *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909).



Fonte : Expert Reviews in Molecular Medicine © Cambridge

Figura 1: Esquema representativo da estrutura do *Toxoplasma gondii*.

Os parasitos desse filo caracterizam-se por uma estrutura de células polarizadas e duas únicas organelas apicais secretoras, os micronemas e as róptrias

(Dubey *et al*, 1998). Estes protozoários não apresentam cílios ou flagelos, tem um único núcleo, geralmente formam cistos e se reproduzem de modo sexuado por singamia (Fortes, 2004) (Figura 1).

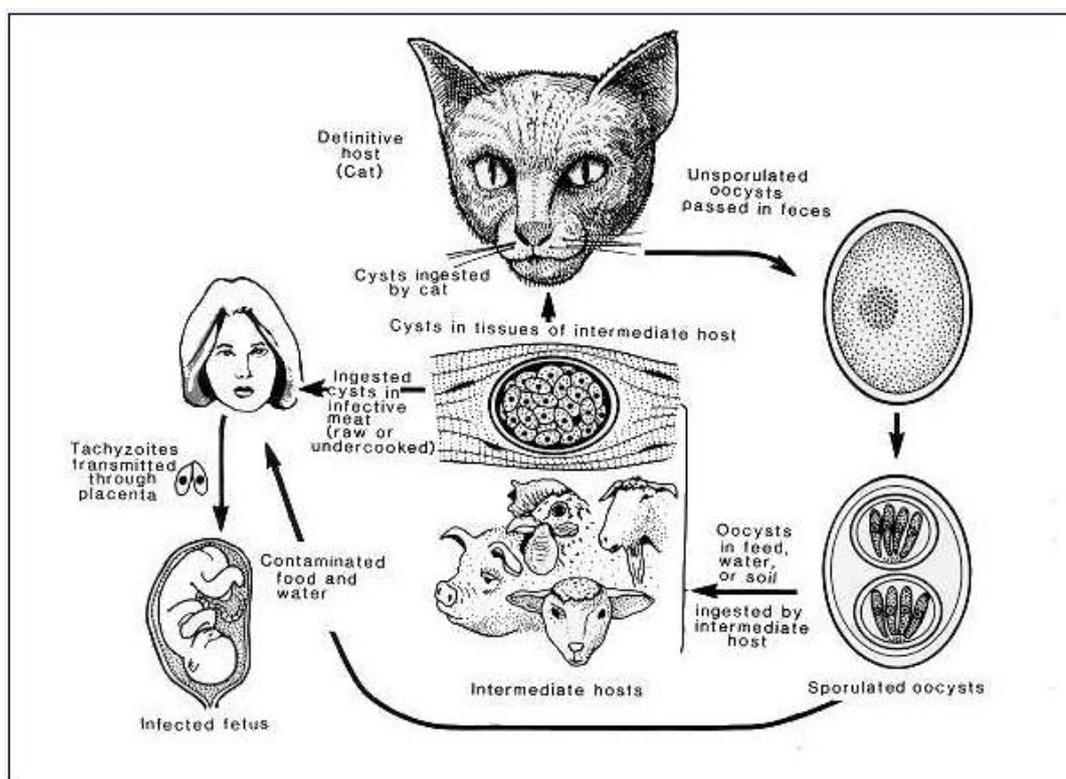
A família Sarcocystidae caracteriza-se por apresentar parasitos heteroxenos com dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos formados nas células intestinais do hospedeiro definitivo (Fortes, 2004). O gênero *Toxoplasma* foi descrito independentemente em 1908 por Splendore, num coelho de laboratório no Brasil e por Nicolle e Manceaux, num roedor norte-africano, *Ctenodactylus gondi*, usado na pesquisa de *Leishmania* no Instituto Pasteur da Tunísia. No ano de 1909, Nicolle e Manceaux criaram o novo gênero *Toxoplasma*. Este gênero tem uma única espécie, *Toxoplasma gondii* um coccídeo intestinal dos Felídeos (hospedeiros definitivos), com uma série de hospedeiros intermediários como aves e mamíferos (Fortes, 2004).

Análises genéticas indicam que o *T. gondii* pode apresentar três linhagens distintas, o tipo I, II e III. Esta classificação está baseada em análises da amplificação de fragmentos do gene SAG2 por PCR, que codificam antígenos da superfície do parasito (Aspinall *et al*, 2003). Cepas do tipo I crescem rapidamente *in vitro*, são muito patogênicas em camundongos, e estão freqüentemente associados com a toxoplasmose ocular e surtos agudos (Grigg *et al* 2001). As linhagens tipo II e tipo III isoladas são menos virulentas em ratos e formam cistos *in vitro*. As cepas do tipo II são comumente isoladas em casos clínicos de toxoplasmose, particularmente em indivíduos imunodeprimidos (Halonen e Weiss, 2009).

Nos seres humanos, as três linhagens causam doença, entretanto, afetam tecidos diferentes. As cepas do tipo I são frequentemente associadas com infecções pós-natal e oculares, enquanto as do tipo II são mais associadas com infecções congênitas e neurotoxoplasmose (Boothroyd e Grigg, 2002).

2. 2. Ciclo Biológico

T. gondii apresenta ciclo biológico heteróxico, aquele que necessita de mais de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida (Figura 2). Nos hospedeiros definitivos, os membros da família Felidae, ocorre replicação sexuada e nos hospedeiros intermediários, aves e mamíferos, ocorre a replicação assexuada. O ciclo biológico envolve três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Fortes, 2004).



Fonte: Dubey *et al*1998.

Figura 2: Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*.

Nos hospedeiros definitivos a evolução do zigoto origina o oocisto, caracterizado por apresentar a película composta por duas membranas e dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Fortes, 2004). Após a ingestão dos oocistos esporulados, por hospedeiros intermediários, os esporozoítos são liberados no trato digestivo, invadem as células intestinais e se multiplicam

como taquizoítos, numa forma de reprodução assexuada. A reprodução assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários como suínos, caprinos, equinos e aves (Fortes, 2004).

Os taquizoítos tem forma de meia-lua e núcleo central medindo 6 μm de comprimento por 2 μm de largura, a extremidade anterior é pontiaguda e a posterior arredondada. Taquizoítos são encontrados em hospedeiros intermediários, onde ocorrem duas fases de desenvolvimento assexuado: na primeira fase taquizoítos invadem as células e se multiplicam rapidamente por endodiogenia levando a formação de pseudocistos que se rompem e liberam taquizoítos que se disseminam para vários tecidos (sistema nervoso central, olho, músculos esqueléticos e cardíacos). Essa forma infectante é a responsável pela manifestação clínica da doença. O sinal clínico mais comum é a elevação da temperatura do animal, a qual foi observada concomitantemente com o aparecimento dos taquizoítos no mesentério e nódulos linfáticos. Geralmente a febre dura por uma semana, neste período os taquizoítos são detectados na circulação (Dubey *et al*, 1980; Wastling *et al* 1993). Na presença de uma resposta imune protetora do hospedeiro, os taquizoítos se transformam em bradizoítos e iniciam a segunda fase do desenvolvimento assexuado (Fortes 1997; Tenter, 2000).

Os bradizoítos são semelhantes aos taquizoítos, diferindo por apresentarem o núcleo próximo a extremidade e apresentam multiplicação lenta. Os bradizoítos vão formar os cistos teciduais, predominantemente em tecidos neurais e musculares, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica). Quando ingeridos por hospedeiros definitivos, a parede dos cistos é digerida por enzimas proteolíticas, liberando bradizoítos que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada com formação de esquizontes e liberação de merozoítos, os quais iniciam a fase sexuada com a produção final de oocistos não esporulados. Se as condições climáticas forem favoráveis, os oocistos sobrevivem no ambiente cerca de 18 meses, ocorrendo a sua esporulação no período de 1 a 5 dias (Dubey e Beattie, 1988; Buxton e Rodger, 2008).

2. 3. Transmissão

A infecção por *T. gondii* pode ocorrer por transmissão congênita, ou por transmissão horizontal. Esta ocorre pela ingestão de cistos encontrados em carne crua ou mal cozida, ingestão de oocistos encontrados em água e alimentos contaminados ou disseminados por vetores mecânicos (Neves, 2005).

A transmissão congênita da toxoplasmose é uma importante causa de abortos em ovinos. Williams *et al* (2005) estudando 53 cordeiros observaram que 7% deles apresentavam toxoplasmose congênita e 90% dos natimortos foram positivos para *T. gondii* nas análises por PCR. No Uruguai, um levantamento realizado entre 1992 e 1994 em diferentes regiões do país demonstrou que as perdas por toxoplasmose ovina, durante a gestação foram de 1,4 a 3,9% (Freyre *et al.*, 1999). No Brasil, Motta *et al* (2008) descreveram a presença de anticorpos anti *T. gondii* em três ovelhas que abortaram. Uma delas teve o feto necropsiado e nele foram observados cistos deste parasito.

A presença de anticorpos anti *T.gondii* no colostro também é um bom indicador da transmissão congênita da toxoplasmose (Innes *et al*, 2009).

Existe a ocorrência de transmissão de formas infectantes do *T. gondii* no sêmen dos seres humanos e touros (Martínez-Garcia *et al*, 1996;. Scarpelli *et al*, 2001), sêmen e leite de cabras (Dubey e Silva, 1980; Chiari e Neves, 1984).

Em ovinos também ocorre transmissão do *T. gondii* através do sêmen. Moraes *et al* (2010) infectaram 41 ovelhas, férteis, com sêmen infectado experimentalmente com diferentes doses do parasito Os animais eram soronegativas no teste de imunofluorescência para *T. gondii* e *Neospora caninum*. As ovelhas foram distribuídas em três grupos, as fêmeas do grupo I (15 ovelhas) foram inseminadas com sêmen contendo $6,5 \times 10^4$ taquizoítos, as fêmeas do grupo II (15 ovelhas) foram inseminadas com sêmen contendo $4,0 \times 10^7$ taquizoítos e as fêmeas do grupo III (11 ovelhas) foram inseminadas com sêmen livre de taquizoítos, grupo controle. No grupo I, 5 (33,3%) ovelhas apresentaram soroconversão. No grupo II todas as fêmeas apresentaram soroconversão- 15/15 (100%). Nenhum dos ovinos do grupo III apresentou anticorpos anti *T. gondii*.

A toxoplasmose pode ser transmitida por órgãos transplantados, neste caso resulta em toxoplasmose aguda no receptor. A incidência de transmissão de toxoplasmose por transplantes de órgãos é atualmente desconhecida. Uma revisão realizada por Montoya *et al* (2001), com transplantes cardíacos no Stanford Medical

Center 1980-1996, demonstrou que em 575 pares de doadores e receptores foram relatados 32 transplantes em que os doadores eram sorologicamente positivos para *T. gondii*, e o receptor era negativo. Desses 32 pacientes, 16 receberam profilaxia para toxoplasmose e nenhum destes pacientes desenvolveram toxoplasmose. Em contraste, quatro dos demais 16 pacientes sem profilaxia desenvolveram toxoplasmose fatal. A toxoplasmose também tem sido relatada após o transplante renal (Renoult *et al.*, 1997). Em transplantes de fígado e de medula óssea, febre, encefalite e pneumonia foram as principais características clínicas observadas nos pacientes nos primeiros 3 meses após o transplante (Weiss *et al.*, 2009).

A infecção pode ocorrer ainda por outros mecanismos como, acidentes laboratoriais e ingestão de leite cru (Tenter *et al.* 2000; Hill e Dubey, 2002).

2. 4. Invasão Celular

A invasão da célula do hospedeiro pelo *T.gondii* é um processo complexo que inclui várias etapas. Inicialmente, o parasito anexa-se frouxamente à superfície da célula do hospedeiro. Essa interação é de baixa afinidade e provavelmente mediada por proteínas de superfície do parasito, a maioria das quais são proteínas GPI ligadas, nomeadas de SAGs (antígenos de superfície), SRSS (seqüências SAG-relacionados) e SUSAs (antígenos de superfície SAG-independentes) (Boothroyd *et al.* 1998; Pollard, *et al.* 2008).

Após fixação, um sinal desconhecido provoca um aumento do cálcio citosólico que estimula a liberação do micronema. A maioria dos principais liberadores do micronema é desconhecido, entretanto, há evidências de que proteínas cinases dependentes de cálcio (CDPK) estão envolvidas. Uma CDPK *Toxoplasma* (TgCDPK1) pode regular a motilidade e invasão da célula (Kato *et al.*, 2008).

Um segundo mecanismo desconhecido estimula a exocitose de proteínas da rópria do parasita. Quatro proteínas (RON2, RON4, RON5 e RON8), localizadas na rópria, ligam-se a uma proteína AMA1 do micronema. Juntas, essas proteínas formam a junção de movimento, que é um complexo na membrana plasmática da célula hospedeira que migra ao longo do comprimento do parasito como produto da invasão (Straub *et al.*, 2009; Alexander *et al.*, 2005).

Durante a invasão, o parasito forma um vacúolo parasitóforo que permite a aquisição eficiente de nutrientes do hospedeiro e evasão das defesas imunitárias (Bradley e Sibley, 2007; Martin e Sinai, 2007). A membrana do vacúolo parasitóforo (PVM) é extensivamente modificada pelo parasito e contém múltiplas proteínas que interagem com as organelas da célula do hospedeiro, incluindo a mitocôndria e o retículo endoplasmático (Ling *et al* , 2006).

O parasito modula as vias de sinalização do hospedeiro, incluindo a via de apoptose (Carmen e Sinai, 2007) que capta sinais especializados na maquinaria de transporte vesicular relacionados com a aquisição de lipídios (Coppens *et al*, 2006). *T. gondii* injeta várias moléculas de sinalização dentro da célula do hospedeiro, resultando em uma extensa remodelação da expressão gênica celular e vias metabólicas (Boothroyd e Dubremetz, 2007). As proteínas do *T. gondii* envolvidas nestas interações com a célula hospedeira foram encontrados na rópria derivados e estão envolvidas no recrutamento de organelas, bem como na regulação direta da transcrição do gene no núcleo (Bradley e Sibley, 2007). As proteínas ROP16 e ROP18, localizadas na membrana do vacúolo parasitóforo estão relacionadas com as cinases que são secretadas para dentro do citoplasma da célula hospedeira durante a invasão (Saeij *et al* 2006; Saeij *et al* 2007; Sibley, 2007; Taylor *et al* 2006). ROP16 STAT altera a sinalização no núcleo da célula do hospedeiro (Saeij *et al* 2007), enquanto o alvo de ROP18 permanece indescritível.

Apesar do progresso sobre a definição da maquinaria necessária para a invasão do parasito, pouco se sabe sobre as estruturas da célula do hospedeiro envolvidas na invasão do parasito. Também não são conhecidas as proteínas de superfície do hospedeiro que interagem com as adesinas do micronemas ou o complexo de junção em movimento. Além disso, não é claro se o parasito pode invadir qualquer região da membrana plasmática ou se procura regiões ricas em lipídios específicos e / ou proteínas (Blader e Saeij, 2009).

2. 5. Patologia

A toxoplasmose geralmente é assintomática, resultando uma infecção latente com cistos teciduais, comum em humanos. A toxoplasmose sintomática é vista em

grupos específicos como fetos, recém-nascidos e indivíduos imunodeprimidos (Weiss e Dubey, 2010).

Segundo Barberan e Marco (1997), o trato uterino não é um ambiente que oferece ideais condições nutricionais e permite a multilocalização e persistência de taquizoítos. Na infecção congênita as conseqüências clínicas são determinadas pelo período gestacional da mãe. Quando a infecção ocorre no início da gestação o sistema imune do feto ainda está imaturo e provavelmente ocorre o aborto. Se a infecção ocorrer no meio da gestação pode resultar em natimortos ou o nascimento de animais fracos, entretanto, quando a infecção ocorre com a prenhez mais avançada os cordeiros nascem clinicamente normais, porém infectados (Buxton, 1990).

Isso ocorre devido à capacidade do feto em montar uma resposta imunológica de perfil Th1, que aumenta à medida que o mesmo amadurece no útero materno (Innes e Vermeulen, 2006).

Remington *et al* (1968) sugeriram que a detecção de anticorpos IgM no sangue do cordão umbilical ou no soro do recém nascido poderia ser útil no diagnóstico da toxoplasmose congênita, uma vez que os anticorpos IgM não atravessam a placenta, enquanto que os anticorpos IgG o fazem.

Em humanos imunocompetentes e em crianças, 10 a 20% dos casos de infecção pelo *T. gondii* são sintomáticos (Remington, 1974). A manifestação mais comum é a linfadenopatia cervical assintomática, mas qualquer dos linfonodos pode ser infectado. Linfadenopatia pode ser acompanhada por febre, mal estar, sudorese noturna, mialgia, dor de garganta, erupção cutânea, dor abdominal e um pequeno número de linfócitos atípicos (<10%). Os sintomas, quando presentes, geralmente desaparecem dentro de alguns meses e raramente persistem por mais de 12 meses (Weiss e Dubey, 2009).

A infecção aguda pelo *T. gondii* é assintomática na maioria das mulheres grávidas. As mulheres infectadas antes da gestação não transmitem a infecção para o seu feto. As manifestações clínicas da toxoplasmose adquirida durante a gestação também variam de acordo com o período gestacional (Weiss e Dubey, 2010).

Em portadores do vírus HIV a manifestação clínica mais comum da toxoplasmose é a encefalite (Luft e Remington, 1992), que ocorre quando a contagem de células T CD4⁺ está abaixo de 200 células / μ L. As manifestações clínicas incluem alterações do estado mental, convulsões, fraqueza, distúrbios dos

nervos cranianos, alterações sensoriais, distúrbios do movimento e manifestações neuropsiquiátricas (Weiss e Dubey, 2009).

2.5.1 Toxoplasmose em ovinos

O primeiro relato de toxoplasmose em ovinos ocorreu em 1942 por Olason e Monlux nos Estados Unidos (Ulon, 1996), onde foram descritas lesões e sinais clínicos da doença. Também foram encontradas as formas típicas do parasito em uma ovelha adulta que havia apresentado sinais nervosos.

Somente a partir 1954, o *T. gondii* foi reconhecido como agente etiológico de abortos da espécie ovina, sendo observado desde então em tecidos da placenta de ovelhas que tiveram os fetos abortados (Hartley *et al* 1954; Hartley & Marshall, 1957).

Segundo Buxton *et al* (2007), sinais clínicos de infecção pelo *T. gondii* em ovelhas prenhes é caracterizada por fetos mortos, embriões mumificados, reabsorção embrionária cordeiros fracos e com baixo peso após o parto. Estes relatos confirmam os encontrados por Moraes *et al*, (2010) onde foi demonstrado que a infecção experimental com o *T. gondii* causa morte a reabsorção embrionária em ovinos. Neste mesmo estudo os animais apresentaram apatia, hipertermia e fezes diarréicas.

Posteriormente outros relatos da infecção em ovinos foram descritos em vários países. No México, dois estudos realizados durante a década de 90 revelaram uma soroprevalência de 20% a 55% em três estados do México, pelo método de IFAT (Cruz-Va'zquez *et al*. 1992). Caballero-Ortega *et al* (2008), encontraram uma frequência alta de toxoplasmose em ovelhas de uma fazenda experimental localizada junto à costa do Golfo do México, com uma estimativa de 2 novos casos a cada ano.

Segundo Tenter *et al*, (2000) a frequência de reações positivas em ovinos varia de 3% no Paquistão e Zibabwe a 92% na França.

No Irã a infecção por *T. gondii* é altamente prevalente em ovinos (Ghorbani *et al* 1983). Razmi *et al* (2010), detectaram soropositividade em 5,2% dos 325 animais estudados na Província de Khorasan, neste mesmo rebanho o parasito foi isolado do cérebro de um feto abortado.

No Brasil, estudos revelam a presença de anticorpos IgG anti *T. gondii* em ovinos. Motta *et al*, (2008) analisando 9 ovinos de uma propriedade do Rio Grande

do Sul, revelaram a existência aborto afetando 58,3% das fêmeas e soropositividade em 33,3% dos animais analisados. No exame histológico evidenciou a presença cistos e taquizoítos no cérebro e córtex de um feto abortado.

Achados histológicos também foram observados por Okuda *et al.* 2007 em surto de aborto ovino diagnosticado no Estado de Minas Gerais.

Soccol *et al.*, (2009) encontraram na área periurbana de Cascavel, Paraná, 17,6% dos animais com sorologia positiva. Na área urbana foram encontradas sorologias positivas em 26,8% dos animais do Parque do Barigui e 60% dos ovinos do Exército Brasileiro.

Devido a esses relatos, a toxoplasmose é considerada a maior causa de problemas reprodutivos em ovinos (Tenter *et al.*, 2000).

2. 6. Resposta Imunológica

Após a infecção, a imunidade natural e a imunidade adquirida trabalham juntas para limitar a multiplicação e a replicação do parasito no estágio de taquizoito (Innes & Vermeulen, 2006). A imunidade natural é a linha de defesa inicial contra os microrganismos, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento da infecção. À medida que a imunidade se adapta à infecção é chamada imunidade adquirida. Esta apresenta memória, grande diversidade e especificidade a diferentes antígenos (Abbas *et al* 2008).

Em resposta à infecção do parasito são produzidos anticorpos IgM anti- *T. gondii*, que são indicativos de infecção recente e não de re-infecção. Com o decorrer da infecção e a maturação da resposta imune, são produzidos os anticorpos IgG . Estes vão apresentar uma maior avidéz, com o passar do tempo, e vão ser maioria na circulação sanguínea (Camargo *et al*, 1991).

A imunidade mediada por células é o mais importante mecanismo na regulação da infecção por *T.gondii*, com a participação das células T CD4⁺, T CD8⁺, macrófagos e células *natural killer* (NK). Durante a infecção aguda, a interleucina-12 (IL-12) é produzida por macrófagos infectados e estimula células NK a liberar interferon gama (IFN- γ) induzindo a direção das células T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , que são críticas para a sobrevivência do hospedeiro. Células T CD8⁺ contribuem para controlar as infecções agudas devido à produção de IFN- γ e ativação

de macrófagos. Células infectadas são destruídas por células T CD8⁺, o que promove a liberação de taquizoítos, que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos como anticorpos, macrófagos ativados e células NK. Assim a formação de cistos é dependente primariamente de mecanismos imunes mediados por IFN- γ (Hegab; Al-Mutawa, 2003).

Sendo assim, o IFN- γ representa o principal mediador de resistência ao *T.gondii* através da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação de parasitos pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que promovem a inativação de enzimas críticas para a replicação do parasito. Outra citocinina importante na regulação da resposta imune celular é a IL-10, que tem efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- γ e a diferenciação de clones Th1 (Silva, 2003).

2. 7. Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose deve combinar as informações clínicas e os dados laboratoriais. O diagnóstico de toxoplasmose é realizado através de testes sorológicos, necropsias de fetos abortados, exame histopatológico, imunistoquímico e da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Pereira-Bueno *et al.*, 2004).

De acordo com Dubey *et al.*, (2004) o exame parasitológico em felinos consiste em demonstrar a presença dos oocistos nas fezes, o que pode ser demonstrado por meio da flutuação ou centrifugação com solução de Sheater. Os oocistos são identificados nas fezes dos felinos no período de eliminação do ciclo enteroepitelial que dura de uma a duas semanas. Entretanto a maioria dos felinos são assintomáticos neste estágio e o exame não é realizado, a menos que haja também o ciclo extra intestinal, quando os felinos apresentam os sinais clínicos da toxoplasmose (Swango *et al.*, 1992).

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose é realizado através da identificação e quantificação de anticorpos anti- *T. gondii* (Camargo, 1996). Em 1948, Albert Sabin e Feldman Harry, desenvolveram o primeiro teste sorológico, o teste do corante, um teste sensível e específico, sem evidência de falsos resultados em humanos.

Entretanto, a utilização deste teste tem sido restrita devido ao uso obrigatório do *T. gondii* vivo o que traz sérios problemas de biossegurança (Kompalic-Cristo et al., 2005; Nakajima-Nakano et al., 2000).

O teste de imunofluorescência utiliza taquizoítos mortos aderidos à lâmina de vidro, que são incubadas com diluições do soro que se deseja investigar, a esta união segue-se uma segunda incubação com anti-imunoglobulina conjugada. Com a ausência dos anticorpos no soro deixará de ocorrer ligação com o anticorpo fluorescente, representando um resultado negativo (D'Agostinho, 1994). Este teste é altamente específico e sensível de fácil realização, sem riscos de contaminação acidental e não requer o organismo vivo (Araújo, 1999). Entretanto esta técnica requer equipamentos especiais e caros como o microscópio de imunofluorescência e as anti-gamaglobulinas específica para cada espécie que vai se realizar o teste (Larsson, 1989).

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) é o teste laboratorial mais comum. Está disponível em kits comerciais, é de rápida execução, baixo custo e não há comprovação de que sofre interferência de fatores inespecíficos como o Fator Reumatóide e anticorpos antinucleares (Wilson, 2003).

No Ensaio Imunoenzimático de Micropartículas (MEIA) a área da superfície das micropartículas aumenta a cinética do ensaio e diminui seu tempo de incubação, tendo a vantagem de poder diferenciar anticorpos de alta e baixa avides, o que confere a capacidade de diferenciar a fase crônica da fase aguda (Abbott AxSym® System, 1996).

O teste de *Western blotting* é utilizado para determinar a quantidade relativa e o peso molecular de uma proteína dentro de uma mistura de proteínas ou de outras moléculas do antígeno. A mistura é submetida a uma separação analítica geralmente por SDS-PAGE, de modo que as posições finais das diferentes proteínas no gel sejam uma função do seu tamanho molecular. O espectro de proteínas separadas é, então, transferido do gel de separação de poliacrilamida para uma membrana de suporte, por ação de capilaridade (*blotting*) ou por eletroforese, de forma que a membrana adquira uma réplica do espectro das macromoléculas separadas presentes no gel. O SDS é removido da proteína e a posição do antígeno protéico na membrana pode então ser detectada pelo acoplamento de um anticorpo específico marcado para àquela proteína fornecendo informações sobre o tamanho e a quantidade do antígeno (Abbas *et al*, 2008).

O teste de Hemaglutinação Indireta revela imunoglobulinas G e M relacionadas a constituintes protéicos intracitoplasmáticos. As vantagens desta técnica são as de dispensar o uso do antígeno vivo, ser prática e apresentar baixos riscos de acidentes laboratoriais, possibilidade de armazenamento no refrigerador, baixo custo e triagem satisfatória (Neto e Marchi, 1999).

O teste é realizado em placas com fundo em V, e possui como princípio as hemácias de aves ou ovinos sensibilizadas com extrato solúvel de taquizoítos de *T. gondii*. Esses permitem a formação de um suporte, possibilitando assim a formação de pontes moleculares na presença do anticorpo específico (hemácias positivas apresentam um aspecto de tapete de hemácias aglutinadas). Na ausência dos anticorpos fica impossibilitada a formação de pontes antigênicas, facilitando a sedimentação das hemácias no fundo da placa, representando um resultado negativo (Neto e Marchi, 1999).

De acordo com Silva *et al.* (2002), o uso da hemaglutinação indireta para a triagem de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de animais tem sido amplamente utilizada devido a sua praticidade e sensibilidade.

3. Objetivos

3. 1. Objetivo Geral

Verificar a existência de toxoplasmose em ovinos utilizados em sistema de produção semi-intensivo e com programa de reprodução assistida.

3. 2. Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de anticorpos IgG anti *T. gondii* no soro dos animais coletados;
- Titular as amostras positivas para anticorpos IgG anti *T. gondii*.

4.0. Material e Métodos

4.1. Amostras

Foram colhidas amostras de sangue, por punção venosa da veia jugular de 113 ovelhas da raça Santa Inês (79 multíparas e 34 nulíparas), dois cães e um gato, de uma propriedade com sistema de produção semi-intensivo e programa de reprodução assistida no município de Entre Rios – Bahia, localizado a uma latitude de 11°56'31" sul e longitude 38°05'04" oeste, com altitude de 162 metros.

As amostras foram centrifugadas a 1500rpm, por cinco minutos para obtenção dos soros, que foram alicotadas em microtubos de polietileno e mantidos a -20°C, até a realização do teste.

4.2. Realização dos testes de Hemaglutinação Indireta (HAI)

Os testes foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, onde os soros foram submetidos ao teste de hemaglutinação indireta (HAI) para detecção de anticorpos IgG anti- *T. gondii*. Os testes para determinação de anticorpos anti- *T. gondii* foram realizados utilizando kits comerciais (Imuno-HAI; WAMA Diagnóstica), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. As amostras de soro foram triadas numa diluição de 1:64. Aquelas com reação positiva, neste ponto de corte, foram novamente diluídas em série, numa razão de dois, até não mais reagirem, para a determinação dos seus títulos.

5.0. Resultados

Das 113 amostras de ovelhas analisadas seis (5,30 %) foram positivas no teste de hemaglutinação indireta. Todas as ovelhas positivas foram multíparas (Tabela 1). Duas amostras foram positivas apenas no ponto de corte 1:64. Na titulação, duas ovelhas apresentaram soropositividade na diluição de 1:128 e duas ovelhas foram positivas na diluição de 1:256 (Tabela 2). Apenas um cão apresentou reação com título de 1:128. O gato testado não apresentou reação neste estudo.

Tabela 1: Detecção de anticorpos IgG anti *T. gondii* em ovelhas nulíparas e multíparas numa propriedade com sistema de criação semi - intensivo e com programa de reprodução assistida.

	Nº de amostras positivas (%)	Nº de amostras negativas (%)	Total
Nulíparas	0 (0%)	34 (100%)	34
Multíparas	6 (5,30%)	73 (92,4%)	79
Total	6	107	113

Tabela 2: Distribuição dos animais positivos de acordo com o título de anticorpos IgG anti *T. gondii*.

Título de anticorpos IgG	Quantidade de amostras positivas	Percentual de amostras positivas
1:64	2	33,3
1:128	2	33,3
1:256	2	33,3
Total	6	100

6.0 Discussão

Em um estudo epidemiológico com dez propriedades de ovinos que utilizavam os sistemas de produção extensivo e intensivo e através do método de imunofluorescência indireta, Silva *et al* (2003) encontraram propriedades com 14,90% a 90,90% de animais positivos para *T. gondii*. DUBEY (1990) considera que os diferentes valores de prevalência encontrados, nos vários estudos epidemiológicos de toxoplasmose, em rebanhos de ovinos, são decorrentes do método sorológico, da região do estudo, da idade e manejo dos animais. Provavelmente, esses fatores devem influenciar na baixa prevalência encontrada, quando comparado com os valores encontrados por Silva *et al* (2003).

Segundo Pinheiro Jr. *et al* (2009), animais criados em sistema extensivo têm 2,3 vezes mais chances de serem infectados que animais que vivem em sistema intensivo, enquanto que os animais que vivem em sistema de criação semi intensivo tem aproximadamente 3,2 vezes mais chances de infecção que animais criados em sistema extensivo. Isso se deve a forma de manejo a qual os animais são submetidos. Na

propriedade estudada o manejo de produção e de reprodução assistida provavelmente tem uma influencia sobre a prevalência encontrada.

Analisando amostras de soros de 123 ovelhas, de duas propriedades submetidos aos testes de hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta com pontos de corte de 1:16 e 1:20, respectivamente, Silva *et al* (2006) encontraram na primeira fase do experimento 39 (44,8%) ovelhas positivas pelo teste de imunofluorescência e 17 (19,5%) através da hemaglutinação. Na segunda propriedade, das 36 ovelhas analisadas, nove (25%) foram reagentes pela imunofluorescência e oito (22,2%) por meio da hemaglutinação. O maior título encontrado foi de 1: 1024 e 1:10240, através da hemaglutinação e imunofluorescência, respectivamente.

Na propriedade estudada o maior título encontrado foi de 1: 256. Provavelmente devido aos diferentes pontos de corte utilizados é que observamos diferenças nos resultados encontrados, um ponto de corte mais baixo é menos específico interferindo na comparação de resultados. Para Camargo *et al* (1996), a discrepância entre os títulos pode ser explicada pelas diferentes técnicas sorológicas adotadas.

O teste de hemaglutinação indireta é um bom indicador de infecção recente, pois anticorpos IgG de baixa avidéz ocorrem no início da infecção com pouco poder aglutinante, resultando em títulos baixos. Segundo Hurtado *et al* (2001) o teste de imunofluorescência é eficiente para o diagnóstico da toxoplasmose, porém a amplificação do PCR é capaz de confirmar os resultados sorológicos incertos.

Poucos relatos na literatura distinguem infecções agudas e infecções crônicas da toxoplasmose ovina. Nas infecções recentes os anticorpos IgG apresentam baixa avidéz sendo crescentes ao longo da infecção (Camargo, 1991). Freire *et al* (1995) definiram animais positivos com títulos de 1: 4096 como portadores de infecção aguda. Figliuolo *et al* (2004) relatam que 36,2% dos ovinos do estado de São Paulo estão provavelmente na fase aguda da infecção por apresentarem títulos sorológicos superiores a 1:1024. Possivelmente títulos mais baixos como 1:256 seriam indicativos de uma infecção crônica.

Com relação à idade, Ogawa *et al* (2003) observaram que existe uma diferença entre a idade do rebanho e o número de ovinos infectados com o *T. gondii*. Animais com idade igual ou superior a dois anos apresentam maior percentual de infecção. Provavelmente devido a isso, todas as ovelhas positivas foram multíparas com idade superior a 12 meses, apresentando maior tempo de exposição ao parasito presente no

ambiente, aumentando a chance de infecção, bem como eventos de gestação e lactação podem ter levado a uma imunossupressão destas ovelhas.

7. 0. Conclusão

Os resultados nos levam a concluir que os animais da propriedade estudada apresentam anticorpos IgG anti *T. gondii*. Indicando que o parasito pode estar presente em propriedades que utilizam programas de reprodução assistida, que mesmo com técnicas de última geração os cuidados básicos de controle higiênico têm que ser intensificados para evitar a contaminação dos animais.

8.0. Referências Bibliográficas

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H. E PIILAI, SHIV. **Imunologia Celular e Molecular**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABBOTT AXSYM® SYSTEM. **Operations Manual**. V.2, 66-6880/R3- February, 1996.

ALEXANDER D. L.; MITAL, J.;WARD, G. E; BRADLEY P, BOOTHROYD J.C. **Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles**. PLoS Pathog;1:e17. [PubMed: 16244709]. 2005

ARAÚJO, F. A. P. **Prevalência de anticorpos toxoplasmícos em frangos abatidos para o consumo humano em Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. Arc. Fac. Vet. UFRS, Porto Alegre. V. 17 p. 23-28, 1989.

ASPINALL, T.V.; GUY, E. C. ; ROBERTS, K.E.; JOYNSON, D.H.M.; HYDE, J. E.; SIMS, P.F.G. **Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications**. Int J Parasitol. Oxford, v.33, n.1, p.97–103, 2003.

BERVERLEY, J. K. A.; WATSON, W. A. **Ovine abortion due to toxoplasmosis** . Nat., n 184, p. 2041, 1959.

BERVERLEY , J. K. A. ; WATSON , W. A. ; SPENSE, J. B. **The pathology of the foetus in ovine abortion due to toxoplasmosis**. Vet. Rec. ; n. 88.p 174- 178. 1971.

BLADER, I. J. and SAEIJ, P. J. **Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence**. Nih Public Access Author Manuscript vol. 117, p. 458–476. 2010.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG M. E. **Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?** Curr Opin Microbiol; 5:438–42. [PubMed: 12160866] 2002.

BOOTHROYD, J. C., AND J. F. DUBREMETZ. **Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma rhoptries***. Nat. Rev. Microbiol. 6:79–88. 2008.

BOOTHROYD JC, HEHL A, KNOLL LJ, MANGER ID. **The surface of *Toxoplasma*: more and less.** Int J Parasitol;28:3–9. [PubMed: 9504330].1998.

Bradley, P. J., and L. D. Sibley. **Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors.** Curr. Opin. Microbiol. 10:582–587. 2007.

BUXTON, D. **Ovine Toxoplasmosis: a review.** Journal of the Royal Society of Medicine 83, 509-511, 1990.

BUXTON, D. and RODGER, S. M. **Toxoplasmosis and neosporosis. In Diseases of sheep.** 4th Ed (ed. Aitken, I. D.) Wiley-Blackwell, Hoboken, 112-118, 2008.

BUXTON, D., MALEY, W.S., ERIGHT, S.E., RODGER, S., BARTLEY, P., INNES, E.A., ***Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story.** Vet. Parasitol. 149, 25–28. 2007

CRUZ-VA'ZQUEZ, C., GARCÍA-VA'ZQUEZ, Z., ROSARIO-CRUZ, R. AND SOLORZANO-SALGADO, M. **Ovine toxoplasmosis in Huitzilac, Morelos, Mexico.** Preventive Veterinary Medicine 12, 27–33. 1992.

CABALLERO-ORTEGA, H., QUIROZ-ROMERO, H., OLAZARA'N-JENKINS, S. AND CORREA, D. **Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and analysis of the humoral response changes in ten months.** Parasitology 135, 1–6. 2008.

CAMARGO, M.E. SIVA, S. M. DA; LESER, P. G. E GRANATO, C. H. **Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*.** Rev. Inst. Med Trop. São Paulo, v.33, p 213 -218, 1991.

CAMARGO, M.E.; **Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da toxoplasmose.** An. Acad. Nac. Med., V., 155, n. 4, p 236-239. 1996.

CARMEN, J. C., AND A. P. SINAI. **Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites.** Mol. Microbiol. 64:904–916. 2007.

COPPENS, I., J. D. DUNN, J. ROMANO, M. PYPAERT, H. ZHANG, J. C. BOOTHROYD, AND K. A. JOINER. ***Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space.** Cell 125:261–274. 2006.

D' AGOSTINHO, L.E. **Diagnóstico sorológico de toxoplasmosis**. Actualización. Acta Bioq. Clin Latinoam., v. 28, n.3. p. 399-403. 1994.

DUBEY, J. P. **Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States**. Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v.196, n. 2, p. 259-262, 1990.

DUBEY J. P. **Toxoplasmosis** J. Am Vet. Med Assoc., v. 205, n. 11. p. 593-598, 1994.

DUBEY, J. P. AND SHARMA, S. P. **Parasitaemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts**. Journal of Parasitology vol. 66, p. 111- 114. 1980.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis – A Waterborne Zoonosis**. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 126, p. 57–72, 2004.

DUBEY, J.P. and BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animal and Man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988.

DUBEY J.P, LINDSAY D.S, SPEER C. A. **Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts**. Clin Microbiol Rev;11:267–99.[PubMed: 9564564].1998.

FIGLIULO, L. P. C. ; KASAI, N. ; RAGOZO, A. M. A.; V. S. O. DE PAULA; R. A. DIAS; S. L. P. SOUZA; GENNARI, S. M. **Prevalence of anti *Toxoplasma gondii* and anti *Neospora caninum* antibodies in ovine from de São Paulo State , Brazil** . Veterinary Parasitology, v. 123, p. 161-166, 2004.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4 ed. Rev. e ampliada; São Paulo: Ícone Editora 2004.

FREYRE, A; BONINO, J.; FALCÓN, J.; CASTELLS, O.;CORREA, A.;CASARETTO, A. **The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay**. Veterinary Parasitology, v.81, n.1 , p.85-88, 1999.

FREIRE, R. L.; GIRALDI, N.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T. **Levantamento soroepidemiológico da toxoplasmose em ovinos na região de Londrina-PR**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Belo Horizonte, v.47, n.4, p.609-612, 1995.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. E. PICHALY, J. R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1º ed. São Paulo, Livraria Varela; 1994.

GHORBANI, M., I. FARZANEH, H. VOSHTANI, AND M. REZAIAN. **Congenital toxoplasmosis in Iran**. Iranian Journal of Public Health 6:1–5. 1983

GRIGG, M. E., J. GANATRA, J. C. BOOTHROYD, AND T. P. MARGOLIS. **Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis**. J. Infect. Dis. 184:633–639. 2001.

HARTLEY, W. J.; MARSHALL, S. C. **Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality** N. Z. Vet. J.; n. 5 11- 24, 1957.

HARTLEY, W. J., JEBSON, J.L. AND MCFARLANE, D.. **New Zealand type II abortions in ewes**. Australian Veterinary Journal 30, 216-218, 1954.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. **Imunophatogenesis of toxoplasmosis**. Clin. Exp. Med 3: 84 – 105. 2003

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

Hill, D. Dubey, J. P. ***Toxoplasma gondii* transmissions, diagnosis and prevention**. Clinical Microbiology and Infections Diseases v.8, p. 634-640, 2002.

HOWE, D. K., AND L. D. SIBLEY. ***Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease**. J. Infect. Dis. 172:1561–1566. 1995.

INNES, E. A. and VERMEULEN, A. N. **Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora***. Parasitology 133, 145-168, 2006.

INNES, A. E.; BARTLEY, P. M.; BUXTON, D. AND KATZER, F. **Ovine toxoplasmosis** Parasitology, 136, 1887-1894. 2009.

IRA J. BLADER AND JEROEN P. SAEIJ **Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence**. Published in final edited form as: APMIS. ; 117(5-6): 458–476. 2009.

Larsson, C. D. **Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose- reações utilizadas e interpretação clínica.** Cães e Gatos, Porto Feliz. p 5-11. 1989.

LING, Y. M., M. H. SHAW, C. AYALA, I. COPPENS, G. A. TAYLOR, D. J. FERGUSON, AND G. S. YAP. **Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages.** *J. Exp. Med.* **203:2063–2071. 2006.**

LUFT, B.J.; REMINGTON, J. S. **Toxoplasmic encephalitis in AIDS (AIDS commentary).** *Clin Infect Dis*;15:211–222. [PubMed: 1520757]. 1992

KATO, N; SAKATA T.; BRETON, G; LE ROCH, K.G.; NAGLE, A.; ANDERSEN, C. **Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility.** *Nat Chem Biol* ;4:347–56. [PubMed: 18454143]. 2008.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. **Diagnóstico molecular da Toxoplasmose: revisão.** *J Bras Patol Med Lab.* Rio de Janeiro, v.41, n.4, p.229-235, 2005.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível: www.agricultura.gov.br : Acesso em: 18/08/2009, 2005.

MARTIN, A. M.; LIU, B. C.; LYNN, T.; AND SINAI, A . P. **The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border.** *J. Eukaryot. Microbiol.* **54:25–28. 2007.**

MARQUES L. C.; COSTA, A. J. **Infecção experimental de ovinos com oocistos e cistos de *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909.** In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1982. 18 Anais, Balneário Camburiú. p 202. 1982.

MOTTA, A. C. DA; VIEIRA M. I. B.; BONDAN C.; MARIA ISABEL A. EDEL WEISS; DAMETTO M. A.; GOMES A. **Aborto em ovinos associado à toxoplasmose: caracterização sorológica, anátomo-patológica e imunoistoquímica.** *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **17, Supl. 1, 204-208, 2008.**

MONTOYA J.G, GIRALDO L.F, EFRON B, STINSON E.B, GAMBERG P, HUNT S, GIANNETTI N, MILLER J, REMINGTON J.S. **Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center.** *Clin Infect Dis*;33:629–640. [PubMed: 11486285]. 2001.

MORAES, E. P. B. X.; BATISTA, A. M.; FARIA, E. B.; FREIRE, R. L.; FREITAS, A. C.; SILVA, M. A. R.; BRAGA, V. A.; MOTA, R. A. **Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep.** *Veterinary Parasitology* v. 170, 318–322. 2010

NAKAJIMA-NAKANO, K.; MAKIOKA, A.; YAMASHITA, N.; MATSUO, N.; ASAI, T. **Evaluation of serodiagnosis of Toxoplasmosis by using the recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms expressed in *Escherichia coli*.** *Parasitol Int.* [S.l.], v.48, n.3, p.215-222, 2000.

NETO, V. A.; Marchi, C. R. *Toxoplasmose* In Cimerman, B; Cimerman, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais.** São Paulo: Atheneu, p. 375. 1999.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 11 ed; São Paulo Editora Atheneu, 2005.

NICOLLE C, MANCEAUX L. **Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi.** *C R Seances Acad Sci* ;147:763–766.1908.

NICOLLE C, MANCEAUX L. **Sur un protozoaire nouveau du gondi.** *C R Seances Acad Sci* ;148:369–372.1909.

OKUDA L. H.; SILVA, G. J.; VILLALOBOS E. M. C.; DEL FAVA, C.; CUNHA E. M. S.; LARA M. C. C. S. H.; DE STEFANO E.; PITUCO E. M. **Toxoplasmose em um rebanho ovino (*Ovis aries*) no Estado de Minas Gerais, Brasil.** Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 13. Campo Grande, 2007. Anais ... Campo Grande: Enapave. 1 CDRoom.

OGAWA, L.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; OLIVEIRA, R. C. ; VIDOTT, O. **Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Londrina no Estado do Paraná.** *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 24, n. 1, p. 57-62, jan./jun. 2003

PEREIRA-BUENO, J.; GUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES- FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M. **Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques.** *Veterinary Parasitology*, v. 121, n.3 , p.33-43, 2004.

PINHEIRO JR. J. W; MOTA, R. A; OLIVEIRA, A. A. DA F; FARIA, E. B; GONDIM, L.F. P; DA SILVA, A.V; ANDERLINI, G. A. **Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil.** *Parasitol Res.* 105:709–715. 2009.

POLLARD A. M, ONATOLU K. N., HILLER L, HALDAR K, KNOLL L. J. **Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii***. Infect Immun;76:103–10. [PubMed: 17938221]. 2008.

RAZMI, G. R.; GHEZI, K.; MAHOOTI, A. AND NASERI, Z. **A Serological Study and Subsequent Isolation of *Toxoplasma gondii* From Aborted Ovine Fetuses in Mashhad Area, Iran**. J. Parasitol., vol. 96, p. 812–814. 2010.

RIET-CORREA, F. **Mortalidade perinatal em ruminantes** In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. Doenças de ruminantes e eqüídeos. v. 2, Santa Maria: Palotti,. p. 455-467. 2007.

REMYINGTON J.S., MILLER M. J, BROWNLEE I. E. **IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II Prevalence and significance in acquired cases**. J Lab Clin Med 71:855–866. [PubMed: 4967457] 1968.

REMYINGTON J.S. **Toxoplasmosis in the adult**. Bull N Y Acad Med ;50:211–227. [PubMed: 4592097].1974.

RENOULT E, GEORGES E, BIAVA M.F., HULIN C., FRIMAT L., HESTIN D, KESSLER M. **Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: Report of six cases and review**. Clin Infect Dis;24:625–634. [PubMed: 9145736] 1997

SIBLEY, D. **Forward genetic approaches for studying virulence in *Toxoplasma gondii***, abstr. S2. Abstr. 10th Int. Wkshps. Opportun. Protists, Boston, MA, 28 to 31 May 2008.

SAEIJ, J. P.; J. P. BOYLE, S. COLLIER, S. TAYLOR, L. D. SIBLEY, E. T. BROOKE-POWELL, J. W. AJIOKA, AND J. C. BOOTHROYD. **Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis**. Science 314:1780–1783. 2006.

SAEIJ, J. P.; COLLIER, S., J. P. BOYLE, M. E. JEROME, M. W.; WHITE, AND BOOTHROYD, J. C. ***Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue**. Nature 445:324–327. 2007.

SANDRA K. HALONEN AND LOUIS M. WEISS. ***Toxoplasma gondii* Presentations at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists: 100 Years and Counting**. Eukaryotic Cell, , p. 437–440. 2009.

SOCCOL, V. T.; CASTRO, E. A.; GAZDA, T. L.; GUILHERME GARCIA, G.; ROSARIA, R.; RICHARTZ, R. T. B.; DITTRICH, R. L. **Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos das áreas urbanas e periurbanas de Curitiba, Paraná.** Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 18, p. 69-70, dez. 2009.

SILVA A. V.; LANGONO, H. **Alimentos de origem animal e a toxoplasmose humana.** Humana Alim., São Paulo. v. 14 n.71. p. 34-39. 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, v.69, n.1, p.7-11, 2002.

SILVA, A.V. DA.; CUNHA, E.L.P.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA,R.A.; LANGONI, H. **Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil.** Ciência Rural, v.33, n.1, p.115-119, fevereiro, 2003.

SILVA, V. M. L.K. E RUE, M.L. **Possibilidade da transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.3 p.892-897, 2006.

STRAUB K, CHENG S, SOHN C, BRADLEY P. **Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements.** Cell Microbiol;11:590–603. [PubMed: 19134112]. 2009.

SWANGO, L. J. *et al.* **Infecções bacterianas riquetsiais, protozoais e outras.** In: Ettinger, S. J. Tratado de Medicina Interna Veterinária, 4 ed. São Paulo: Manole Ltda, v. 1 p. 2577, 1992.

TAYLOR, S., A. BARRAGAN, C. SU, B. FUX, S. J. FENTRESS, K. TANG, W. L. BEATTY, H. E. HAJJ, M. JEROME, M. S. BEHNKE, M. WHITE, J. C. WOOTTON, AND L. D. SIBLEY. **A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*.** Science 314:1776–1780. 2006

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L. M. ***Toxoplasma gondii*: from animals to humans.** International Journal for Parasitology, Brisbane, n.12/13, v.30, p.1217- 1258, 2000.

ULON, S. N. **Inquérito sorológico de infecções toxoplasmáticas em ovinos abatidos em Santa Maria, RS e sua repercussão na saúde pública.** Santa Maria 78f Dissertação (Mestrado) Faculdade de Veterinária, Universidade de Santa Maria, 1996.

UZÊDA R. S; FERNANDEZ, S. Y.; JESUS, E. E. V.; PINHEIRO, A. M.; AYRES, M.C.C.; SPINOLA, S.; BARBOSA JUNIOR, H. V.; ALMEIDA, M. A. O. **Fatores relacionados à presença de anticorpos IgG anti-Toxoplasma gondii em caprinos leiteiros do Estado da Bahia.** Rev Bras Saúde Prod Anim 5:1–8. 2004.

WASTLING, J. M.; NICOLL, S. AND BUXTON, D. **Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep.** Journal of Medical Microbiology, vol. 38, p. 360-565. 1993.

WEISS, L. M. E DUBEY J. P. **Toxoplasmosis: a history of clinical observations.** J Parasitol. Vol. 38/39 895–901, 2009.

WILLIAMS, R. H., MORLEY, E. K., HUGHES, J. M., DUNCANSON, P., TERRY, R. S., SMITH, J. E. AND HIDE, G. **High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine host.** Parasitology. 130, 301-307. 2005

WILSON, M.; JONES, J.L.; MCCAULEY, J.B. ***Toxoplasma*.** In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A.; Tenover, R.H. Manual of Clinical Microbiology, vol 2, 8th ed. ASM Press; p.1970-80. 2003