

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CARCARÁS (*Caracara  
plancus*, MILLER, J. F ., 1777) COM *Toxoplasma gondii*  
(AMOSTRA ME49)**

**Sérgio Netto Vitaliano**

**Orientador: Profa. Dra. Karin Werther**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

JABOTICABAL, SP - BRASIL

Julho/2007

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**SÉRGIO NETTO VITALIANO** – nascido em Uberlândia, em 26 de julho de 1978. Formou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em julho de 2004. Durante o período de graduação foi bolsista do CNPq por dois anos (2002-2003 e 2003-2004) e membro ativo da Associação Acadêmica Atlética por cinco anos. Em março de 2005 ingressou no Programa de pós-graduação (mestrado) em Medicina Veterinária, pelo Departamento de Patologia Animal da FCAV-Unesp, campus Jaboticabal, onde também auxiliou no serviço de atendimento médico veterinário do Ambulatório de Animais Silvestres do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel.

“Pouco conhecimento faz com que as criaturas se sintam orgulhosas.  
Muito conhecimento, que se sintam humildes.  
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça  
para o céu, enquanto as que as cheias as baixam para a terra, sua mãe!”

(Leonardo da Vinci)

“Grandes poderes trazem grandes responsabilidades.”

(Ben Parker)

**DEDICO,**

À minha família, que sem sombra de dúvida  
é o principal pilar que sustenta a pessoa que me tornei.

À natureza, que necessita que nós a olhemos  
com mais carinho, que nos tornemos agentes conservadores

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Karin Werther, minha orientadora, não só por sua inestimável orientação, mas também por ser grande responsável pela formação do profissional que me tornei.

À Profa. Dr. Rosangela Zacarias Machado por estar sempre presente, por sua paciência e por ceder tão gentilmente o laboratório.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari e a toda equipe do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Veterinária pelo auxílio na realização dos hemogramas.

À Profa. Dra. Eloísa Ferro da Universidade Federal de Uberlândia, por gentilmente ter cedido os roedores para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte por sua colaboração e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, por sua amizade, confiança e seus valorosos conselhos.

À Médica Veterinária e pesquisadora Dra. Deise Aparecida, por estar sempre disposta a ajudar e por sua inestimável amizade.

À minha namorada, Thassila, pelo seu apoio, carinho, compreensão e por estar sempre presente nesses quase dois anos inesquecíveis de convivência.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio, inclusive financeiro.

Ao meu amigo Tiago, cujo auxílio foi indispensável desde a concepção até a execução deste trabalho. E a sua família, Fernanda e Isabella, pelo carinho.

Ao Eugênio de Campos Filho, do Laboratório Clínico, pelo auxílio na leitura das lâminas de diferencial do leucograma.

À Chica e Lia, pela paciência e auxílio no preparo das lâminas para histologia.

Ao Tel, Edgar, Arvelino, Ronaldo, Moema e Karine pela amizade, ajuda e pelo PBS.

Aos colegas de pós-graduação Andrea, Andréa Boeur, Trícia, Patrícia, Ana Carolina, Meire, Gisele, Ana Beatriz, Ligia, Adriano, Marcos André, Daniel, Oliveira e Rafael pela amizade, bom convívio e pela ajuda nas mais diversas etapas deste trabalho.

Às Médicas Veterinárias, residentes do ambulatório de silvestres, Carolina e Cinthia pelo apoio e amizade.

À Médica Veterinária, residente da patologia, Geórgia Modé pelo auxílio na leitura das lâminas de histopatologia.

Ao meu amigo Wanderson e sua esposa e também amiga Joyce pela amizade e pelo apoio na execução deste trabalho.

Aos meus companheiros de república, melhor dizendo, grandes amigos Lorivaldo, Guilherme, André, Roberto, João Paulo, Alexandre, Alexandre Brum, Thiago, Luís Guilherme, Luciano, Andriago, Marcos, Daniel, Daniel Gerardi, Emílio, Gustavo e André Galvão, por esses anos nos quais vocês tornaram a minha vida em Jaboticabal bem mais agradável.

Aos meus amigos Fabrício e Marcos Thalma e a todos os amigos que deixei para trás, por sempre, mesmo que longe, estarem presentes em minha vida.

Ao meu amigo Paulo, pela inspiração e tranquilidade sempre necessárias.

À minha antiga banda, que em alguns momentos me possibilitou reviver um passado saudosos.

Ao meu bom e velho amigo Rock n' Roll, por tudo.

Ao São Paulo Futebol Clube, por tantas alegrias ao longo dos anos.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e valiosas sugestões para o enriquecimento do projeto de pesquisa e ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao IBAMA, por permitir a realização deste trabalho.

Às aves que deram a vida para realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Revisão de literatura.....	02
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e Histórico.....	02
2.2. Ciclo biológico e transmissão.....	03
2.3. Sinais clínicos.....	06
2.4. Resposta Imune ao parasito.....	07
2.5. Anatomopatologia.....	08
2.6. Toxoplasmose.....	08
2.7. Infecção por <i>T. gondii</i> em animais selvagens.....	09
2.8. Infecção por <i>T. gondii</i> em aves.....	11
2.9. Diagnóstico.....	13
2.10. Carcará ( <i>Caracara plancus</i> ).....	14
3. Objetivos.....	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. Material e Métodos.....	18
4.1. Aves.....	18
4.2. <i>Calomys callosus</i> .....	18
4.3. Infecção Experimental e colheita de material.....	19
4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	20
4.5. Necropsia.....	21
4.6. Exame Histopatológico.....	22
4.7. Reação de Imunoistoquímica.....	22
4.8. Reação de Imunofluorescência Direta em Tecidos.....	23
4.9. Bioensaio em camundongos.....	24
4.10. Pesquisa do DNA de <i>T. gondii</i> pela PCR.....	24



4.10.1. Extração do DNA das amostras de tecido das aves infectadas.....	25
4.10.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
4.10.3. Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR.....	25
4.11. Análise Estatística.....	25
5. Resultados.....	26
5.1. Sinais clínicos.....	26
5.2. Patologia clínica.....	28
5.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	28
5.4. Exame necroscópico.....	32
5.5. Exame histopatológico.....	34
5.6. Imunoistoquímica (IHQ).....	37
5.7. Reação de Imunofluorescência Direta em Tecidos (IFDT).....	38
5.8. Bioensaio em camundongos.....	40
5.9. Pesquisa do DNA de <i>T. gondii</i> pela PCR.....	41
6. Discussão.....	42
7. Conclusões.....	50
Referências bibliográficas.....	51

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1:	Parâmetros hematológicos dos carcarás infectados experimentalmente por <i>T. gondii</i> e não infectados, com os valores de referência encontrados na literatura.....	28
Tabela 2:	Títulos de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soros dos carcarás experimentalmente infectados, ao longo do período experimental (68 dias).....	30
Tabela 3:	Lesões microscópicas encontradas nos órgãos das aves não infectadas e infectadas por <i>T. gondii</i> .....	35
Tabela 4:	Aves e os respectivos órgãos onde <i>T. gondii</i> foi encontrado pela Reação de Imunoistoquímica.....	37
Tabela 5:	Órgãos de aves infectadas e não infectadas, nos quais foi detectado <i>T. gondii</i> pela Reação de Imunofluorescência Direta em Tecidos.....	39
Tabela 6:	Soroconversão de camundongos BALB/c inoculados intraperitonealmente com macerado dos órgãos (cérebro, coração e músculo esquelético) das aves infectadas por <i>T. gondii</i> .....	41

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1:	Ciclo biológico de <i>T. gondii</i> .....	05
Figura 2:	Foto de um Carcará ( <i>Caracara plancus</i> ).....	16
Figura 3:	Foto do roedor <i>Calomys callosus</i> .....	19
Figura 4:	Variação do peso (g) dos carcarás infectados com <i>T. gondii</i> e das aves do grupo controle durante o período experimental.....	27
Figura 5:	Variação da temperatura (°C) dos carcarás infectados com <i>T. gondii</i> e das aves do grupo controle durante o período experimental.....	27
Figura 6:	Cinética da resposta imune humoral em carcarás experimentalmente infectados (aves 1, 4, 6, 7 e 8) com <i>T. gondii</i> , por meio da reação de imunofluorescência indireta.....	31
Figura 7:	Imunofluorescência positiva para <i>T. gondii</i> representativa dos soros das aves infectadas. Observar fluorescência ao redor de todo o parasito, objetiva 40 x.....	32
Figura 8:	Foto de intestino delgado da ave 7 (grupo infectado – G1), apresentando dilatação acentuada de porções de alças.....	33
Figura 9:	Foto de pulmão da ave 8 (grupo infectado – G1), apresentando áreas de hemorragia.....	33

Figura 10:	Foto de baço da ave 8 (grupo infectado – G1), com manchas enegrecidas.....	34
Figura 11:	Fotomicrografia de cortes de cérebro (A), coração (B), músculo esquelético (C) e intestino (D), mostrando a presença de <i>T. gondii</i> pela técnica de Imunoistoquímica – Objetiva 40x.....	37
Figura 12:	Fotomicrografia de corte de músculo esquelético de ave controle negativo para presença de <i>T. gondii</i> pela técnica de imunoistoquímica - Objetiva 40x.....	38
Figura13:	Fotomicrografia de cortes de cérebro (A), fígado (B), rim (C) e músculo esquelético (D), mostrando a presença de <i>T. gondii</i> pela técnica de Imunofluorescência Direta em Tecidos – Objetiva 40x.....	39
Figura14:	Fotomicrografia de corte de músculo esquelético de ave controle negativo para presença de <i>T. gondii</i> pela técnica de imunofluorescência direta em tecidos - Objetiva 40x.....	40
Figura 15:	Gel de leitura da PCR das aves infectadas e não infectadas. A seta mostra a marcação de banda específica do controle positivo da reação.....	41

## INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CARCARÁS (*Caracara plancus*, MILLER, J. F., 1777) COM *Toxoplasma gondii* (AMOSTRA ME49)

**RESUMO** – O presente trabalho objetivou estudar a susceptibilidade do carcará (*Caracara plancus*) frente à infecção experimental pela amostra ME49 de *Toxoplasma gondii* pela observação da sintomatologia clínica, análise dos parâmetros hematológicos, estudo da cinética de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, e constatação da presença do parasito nos diversos tecidos utilizando a imunoistoquímica, imunofluorescência direta em tecidos, bioensaio em camundongos e PCR. Sete carcarás soronegativos para anticorpos anti-*T. gondii* foram separados em dois grupos: G1 (grupo infectado – 5 aves) e G2 (grupo controle – 2 aves). As aves do grupo G1 foram alimentadas durante três dias consecutivos com roedores *Calomys callosus* previamente infectados com *T. gondii* e as aves do grupo G2 foram alimentadas com roedores não infectados. As aves infectadas não apresentaram sintomas clínicos de toxoplasmose, tampouco alterações nos parâmetros hematológicos. Todas as aves infectadas soroconverteram. A soroconversão das aves experimentalmente infectadas ocorreu a partir do sétimo dia pós-infecção, os picos iniciais na produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ocorreram entre 15 e 30 dias pós-infecção sendo que em seguida houve uma tendência de queda dos títulos de anticorpos. No momento da necropsia não foram encontradas lesões sugestivas da infecção por *T. gondii*. Não foi observado no exame histopatológico a presença do parasito nos diversos tecidos amostrados das aves infectadas, entretanto em uma das aves do grupo não infectado e sorologicamente negativa para anticorpos anti-*T. gondii*, foi encontrado um cisto tecidual na musculatura. Pelas técnicas de imunoistoquímica e imunofluorescência direta em tecidos o parasito foi encontrado em pequeno número em diversos tecidos, porém tanto nas aves do grupo infectado quanto nas aves do grupo controle. Utilizando o bioensaio em camundongos, só foi possível a confirmação da presença do parasito no coração de duas aves do grupo infectado. Neste estudo, os carcarás experimentalmente infectados não apresentaram sintomas clínicos, alterações hematológicas e com fraca distribuição do parasito nos tecidos, sendo portanto, resistentes à infecção por *T. gondii*.

Palavras-chave: Falconiformes, RIFI, histopatológico, imunoistoquímica, imunofluorescência direta em tecidos, bioensaio, PCR.

**EXPERIMENTAL INFECTION OF CRESTED CARACARA (*Caracara plancus*,  
MILLER, J. F., 1777) WITH *Toxoplasma gondii* (Me49 STRAIN)**

**SUMMARY** – The present study aimed to evaluate the susceptibility of crested caracara (*Caracara plancus*) to experimental infection with ME49 strain of *Toxoplasma gondii*, through clinical symptoms, hematological parameter analysis, kinetics of specific IgG antibodies to *T. gondii*, and parasite detection by immunohistochemistry, direct immunofluorescence, bioassay, and PCR. Seven crested caracara, seronegative to *T. gondii* antibodies, were separated into two groups: G1 (infected group - 5 birds), and G2 (control group – 2 birds). G1 birds were fed during three successive days with *Calomys callosus* previously infected with *T. gondii*, and G2 birds were fed with non-infected rodents. The infected birds did not present clinical symptoms, nor significant changes in hematological parameters. All infected birds had antibody titers to *T. gondii*. IgG antibodies to *T. gondii* were first detected at 7 dpi, with production peaks between 15 and 30 dpi, which were followed by a sharp decrease in detectable antibodies. No gross lesions suggestive of *T. gondii* infection were observed. By histopathological examination, it was not possible to observe the presence of the parasite in the infected birds' organs, however, in one bird of the control group, a *T. gondii* tissue cyst was visualized in muscle. By immunohistochemistry and direct immunofluorescence, the parasite was found in small number in different organs, although in animals from both groups. The presence of *T. gondii* was confirmed in heart samples of two bioassayed birds, both from the infected group. In this study, the experimentally infected crested caracaras did not show clinical symptoms, alteration on hematological parameters and the parasite was found in small numbers in the organs of the birds, for these reasons the crested caracara were resistant to *T. gondii* infection.

Key-words: Falconiformes, serology, IFAT, histopathological examination, immunohistochemistry, direct immunofluorescence, bioassay, PCR

## 1. INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, com distribuição geográfica cosmopolita, capaz de infectar células nucleadas de uma ampla variedade de mamíferos e aves, inclusive o ser humano. Entretanto, o parasito produz infecção assintomática na maioria de seus hospedeiros, devido à rápida indução da resposta imune celular, o que resulta no controle da multiplicação dos taquizoítas e estabelecimento de uma infecção crônica (YAP & SHER, 1999).

Nos animais, o interesse na avaliação da ocorrência de toxoplasmose é maior em torno das espécies que coabitam com o homem ou que lhe servem de fonte de alimento, porque de uma maneira ou de outra, estes animais podem desempenhar o papel de reservatórios das infecções humanas (SOGORB et al., 1972). Embora pesquisas indiquem que os animais selvagens são freqüentemente positivos nos testes sorológicos para *T. gondii* (DUBEY & BEATTIE, 1988; DRESSEN, 1990), o papel da vida selvagem na transmissão de *T. gondii* não é bem conhecido (HUMPREYS et al., 1995). Dados experimentais indicam que aves predadoras (corujas e outros rapinantes) são resistentes a *T. gondii* (LINDSAY et al., 1991; DUBEY et al., 1992).

A constante interferência do homem na natureza tem causado transformações e danos muitas vezes irreparáveis. A expansão de áreas ocupadas pela população humana acarreta em perda de hábitat de espécies selvagens e as obriga ocupar áreas cada vez menores, levando a uma situação de desequilíbrio. Essa situação não só pode levar à diminuição populacional de várias espécies animais e vegetais podendo chegar à extinção, como também selecionar espécies que se adaptam melhor à presença do homem, espécies sinantrópicas.

Os seguintes fatores justificam a necessidade deste projeto: (1) a escassez de informações referentes à infecção por *T. gondii* em carcarás; (2) a importância que estes animais possam desempenhar na cadeia epidemiológica da toxoplasmose, considerando que são aves carnívoras e utilizam grandes áreas para sua sobrevivência; e (3) o fato de serem uma espécie sinantrópica.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Toxoplasma gondii* e histórico

*Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *T. gondii*. *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório que infecta uma ampla variedade de mamíferos e aves, inclusive o ser humano, caracterizando seu potencial zoonótico. Apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita e possivelmente é capaz de infectar e se replicar em todas as células nucleadas de mamíferos e aves (WONG & REMINGTON, 1993; DUBEY, 1998), sendo que no caso das aves pode ser observado inclusive nos eritrócitos, por serem células nucleadas (MANWELL, 1941; WOLFSON, 1941).

Foi descrito pela primeira vez em 1908 por SPLENDORE em São Paulo, no Departamento de Bacteriologia do Hospital da Sociedade de Beneficência Portuguesa, em coelhos de laboratório, e por NICOLE & MANCEAUX, no mesmo ano, que o encontraram no cérebro de um roedor (*Ctenodactylus gondii*) do Norte da África (*apud* BLACK & BOOTHROYD, 2000). O nome deste roedor deu nome à espécie do parasito (PFEFFERKORN, 1990) e o nome do gênero deriva das palavras gregas *taxon* (arco) e *plasma* (forma), devido à forma alongada e em lua crescente em que o parasito é mais comumente observado (NETO et al., 1995). Em aves foi observado primeiramente por CARINI (1911) em lâminas preparadas a partir de fígado e baço de um pombo em São Paulo. Houve relatos anteriores de parasitos semelhantes ao *Toxoplasma* em pardais e outros pássaros, porém, posteriormente eles foram considerados hemoprotozoários (LAVERAN, 1900; ADIE, 1908; ARAGÃO, 1911).

Estudos recentes da estrutura genética de diferentes populações de *T. gondii* indicam que o parasito é originado da América do Sul e se espalhou pelo mundo através de pelo menos dois eventos migratórios: o primeiro evento, foi provavelmente um evento raro, como uma migração errática de alguma ave infectada para a Eurásia, originando uma população distinta; o segundo evento, mais recente, ocorreu devido ao

trânsito intenso de navios mercantes com condições sanitárias precárias e povoados de animais como roedores e gatos, ocorrido principalmente durante os séculos XVI, XVIII e XIX, levando o parasito da Eurásia para outros continentes (LEHMANN et al., 2006).

## 2.2. Ciclo biológico e transmissão

O ciclo biológico de *T. gondii* (Figura 1) envolve dois hospedeiros, definitivos (felídeos) e intermediários (demais espécies de mamíferos e aves) (BLACK & BOOTHROYD, 2000), caracterizando-se, portanto, um ciclo heteroxeno.

A fase sexuada do ciclo reprodutivo de *T. gondii* ocorre no epitélio intestinal dos felinos domésticos ou selvagens, quando os mesmos ingerem oocistos ou cistos teciduais contendo bradizoítas (BLACK & BOOTHROYD, 2000). O termo bradizoíta foi dado por FRENKEL em 1973 para descrever o organismo se multiplicando lentamente dentro do cisto. Da reprodução sexuada resultam oocistos imaturos que são eliminados nas fezes dos gatos a partir de duas a três semanas após a infecção. Esses oocistos são eliminados por um período que pode variar de 7 a 20 dias. No ambiente eles necessitam de no mínimo 24 horas para esporularem (SULLIVAN & PARDO, 1993). Após a esporulação, eles são infectantes para qualquer animal de sangue quente, inclusive o ser humano. No meio externo, os oocistos maduros resistem durante vários meses, podendo chegar a anos. Oocistos esporulados são esferoidais e apresentam no seu interior 2 esporocistos elipsoidais, cada um com 4 esporozoítas, que se desenvolvem na presença de oxigênio e em temperaturas mais baixas que a corpórea (DUBEY, 1998). Quando os oocistos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, os esporozoítas são liberados no tubo digestivo e penetram preferencialmente nas células do sistema fagocítico mononuclear. Multiplicam-se rapidamente sob a forma de taquizoítas no interior das células hospedeiras que são lisadas, liberando esses parasitos para o meio extracelular, onde estão livres para invadir novas células (SULLIVAN, 1993). Eles invadem as células hospedeiras por penetração ativa, liberando enzimas proteolíticas (FRENKEL, 1988; DUBEY et al., 1998). A seguir, espalham-se pelo resto do corpo do hospedeiro via sangue e linfa (VIDOTTO, 1992). O

termo taquizoíta, também dado por FRENKEL em 1973, substitui os termos previamente utilizados trofozoíto e endozoíto (DUBEY, 1987; DUBEY et al., 1998). Os taquizoítas são a principal forma infectante de *T. gondii*. Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais, incluindo pulmões, fígado e rins, eles são mais prevalentes nos tecidos neurais e musculares, incluindo o cérebro, olhos e músculos cardíaco e esquelético. Cistos teciduais intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por toda a vida do hospedeiro, em estado de latência, sem causar uma resposta inflamatória (PETRAK & CARPENTER, 1965; HESSLER et al., 1971; DUBEY, 1986; DUBEY et al., 1998).

A transformação de taquizoíta em bradizoíta ocorre no momento em que o hospedeiro começa a desenvolver resposta imune que atua sobre a multiplicação dos taquizoítas, os quais passam a dividir-se mais lentamente, sendo então denominados bradizoítas. Estes encontram-se confinados em cistos, protegidos contra a ação do sistema imune e de drogas. As células hospedeiras podem tolerar uma carga muito maior de bradizoítas do que de taquizoítas (FRENKEL, 1988). Desta forma, observa-se que a imunidade não determina o fim da infecção, mas impede a multiplicação de taquizoítas e a destruição da célula hospedeira (SHARMA, 1990).

A infecção é dividida em duas fases: a fase aguda ou proliferativa, na qual o parasito é encontrado na forma de taquizoíta e a fase crônica ou latente, na qual o parasito é encontrado na forma de bradizoíta. Após a fase aguda (8 a 10 dias), a infecção passa para a fase latente (McLEOD et al., 1991). Os parasitos permanecem nessa forma cística até uma queda na resistência do sistema imune, ou caso isto não ocorra, perdura por toda a vida do hospedeiro (AMBROISE-THOMAS; PELLOUX, 1993).

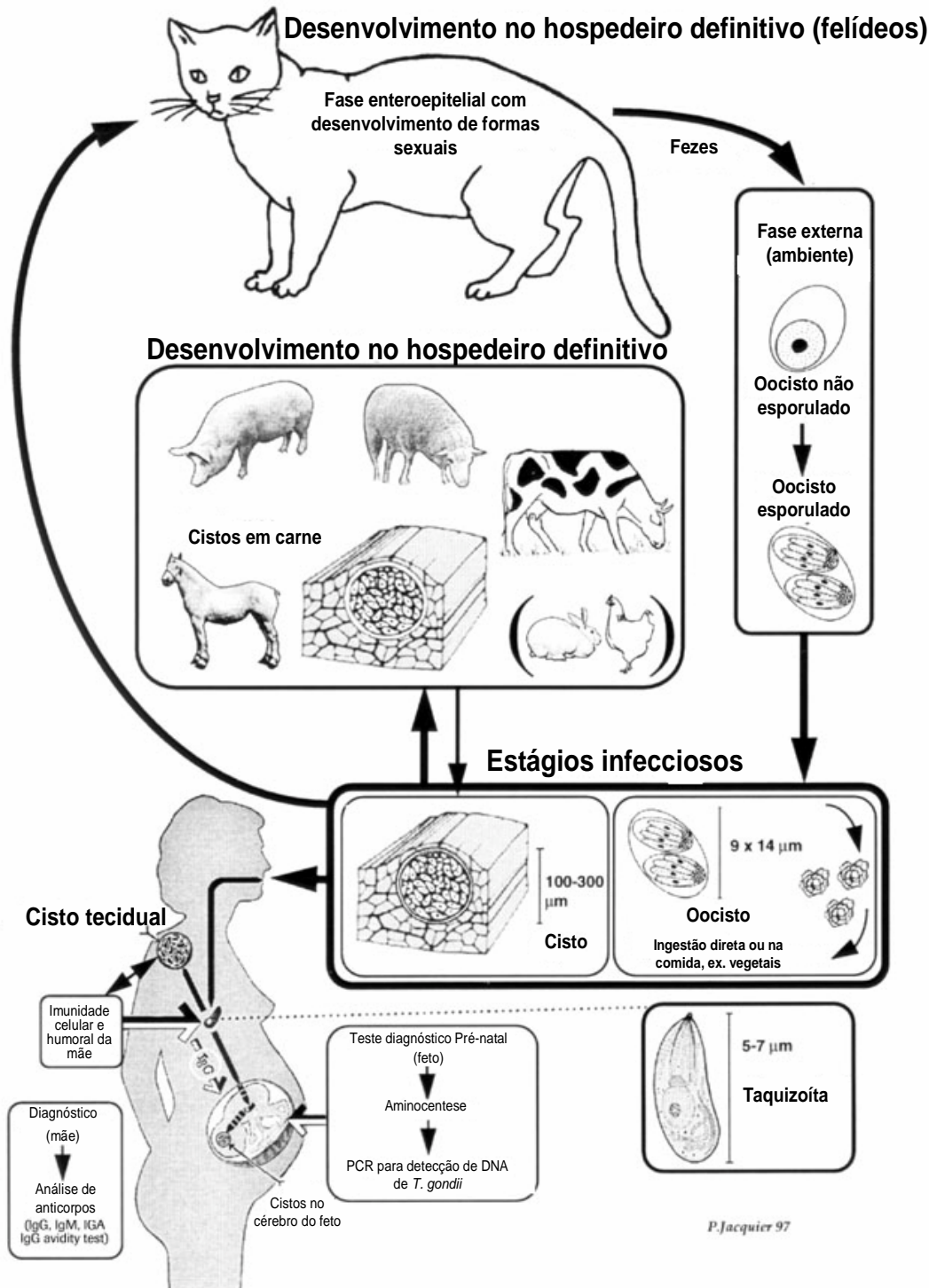


Figura 1: Ciclo biológico de *T. gondii* (modificado de JACQUIER, P., 1997).

A transmissão de *T. gondii* pode ocorrer pela via vertical (congênita) ou horizontal (oral). A infecção congênita pode ocorrer quando uma fêmea gestante é primo-infectada ou por ocasião de reagudização devido à imunossupressão. Durante a parasitemia, *Toxoplasma* atravessa a placenta e invade os tecidos do feto em desenvolvimento. Embora a infecção transplacentária possa ocorrer em qualquer estágio da gestação, o feto é mais gravemente afetado quando a mãe se infecta durante a primeira metade da gestação (DUBEY, 1986). A transmissão horizontal ocorre normalmente pela via oral através da ingestão de cistos teciduais presentes em hospedeiros intermediários, ou ingerindo oocistos presentes no ambiente e em alimentos contaminados com fezes oriundas do hospedeiro definitivo. Os oocistos, após serem ingeridos, são rompidos por digestão química no duodeno, liberando esporozoítas que irão colonizar as células intestinais do hospedeiro.

Embora *T. gondii* possa ser transmitido através de transfusão de sangue e transplantes, esses modos de transmissão são menos comuns que a ingestão de oocistos esporulados ou cistos teciduais (DUBEY, 1986; TENTER, 1999). Entretanto, na maioria dos casos, não é conhecido qual dessas vias é epidemiologicamente mais importante. É provável que as fontes principais de infecção por *T.gondii* variem nas diferentes populações humanas, dependendo dos hábitos culturais e alimentares (TENTER, 1999). Existe também a possibilidade da disseminação do parasito nos zoológicos através de equipamentos de uso diário utilizados concomitantemente nos recintos dos felinos e de outros animais, tais como botas, luvas, pás, vassouras e mangueiras (DUBEY, 1986), além da presença de gatos errantes que podem transitar por todo o zoológico.

### **2.3. Sinais clínicos**

Os sinais clínicos da toxoplasmose são atribuídos à ruptura celular secundária à replicação do parasito, necrose celular associada à reação de hipersensibilidade tardia e vasculite por imunocomplexos (LAPPIN et al., 1989).

Nas mais de 200 espécies de mamíferos e aves selvagens que foram identificadas como hospedeiros intermediários de *T. gondii*, os sinais clínicos incluem: letargia, anorexia, hipertermia, diarreia, dispnéia, incoordenação motora, linfadenite, problemas oculares (retinocoroidite, uveíte), abortos e morte súbita (DOBOS-KAVÁCS et al., 1974; DUBEY, 1986; VIDOTTO, 1992; PATTON, 1993).

Pombos domésticos (*Columba livia*) naturalmente infectados apresentaram anorexia, incoordenação, emaciação, conjuntivite com a presença de organismos no exsudato ocular e convulsões na hora da morte (CARINI, 1911; REIS & NÓBREGA, 1936). Em 30 perdizes (*Alectoris rufa*) experimentalmente infectadas, somente 2 (6,6%) das aves infectadas apresentaram sinais clínicos (anorexia, incoordenação, prostração, eriçamento de penas e diarreia amarelada) e posteriormente vieram a óbito. As demais aves permaneceram clinicamente normais (MARTÍNEZ-CARRASCO et al., 2005).

#### **2.4. Resposta imune ao parasito**

Os tratados clássicos de imunologia referem-se a duas formas de imunidade adquirida: a imunidade humoral e a imunidade celular (ABBAS et al., 2002). No complexo processo de interação do hospedeiro com seus parasitos, a resposta humoral e celular estão intimamente relacionadas, e por isso, devem ser abordadas simultaneamente. A multiplicação ativa dos taquizoítas no interior das células, durante o estágio agudo da infecção, é combatida por ambos mecanismos imunológicos, sendo a resposta imune celular a de maior importância no controle da infecção, a qual apresenta um perfil predominantemente Th1 (INNES, 1997). Durante a fase inicial da doença e antes do desenvolvimento da imunidade específica, *T. gondii* pode ser encontrado em diferentes tecidos e órgãos, e normalmente estão acompanhados por uma reação inflamatória mononuclear em pequenos focos de necrose (OLIVEIRA et al., 2000). A imunidade a *T. gondii* é mediada por células T, junto aos macrófagos e às células exterminadoras naturais (NK). O contato prévio do hospedeiro com o protozoário é indicado pela presença de anticorpos específicos. Em pombos (*Columba livia*) experimentalmente infectados por *T. gondii*, anticorpos IgG foram detectados nos

primeiros cinco dias pós-infecção, atingindo picos máximos de produção aos 10 dias pós-infecção. A técnica utilizada foi a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando o conjugado heterólogo (anti-IgG de galinha), (MINEO et al., 2004).

## 2.5. Anatomopatologia

Lesões macroscópicas na toxoplasmose incluem hemorragias do intestino e fígado, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia. Microscopicamente são encontradas reações inflamatórias com infiltrado celular predominantemente mononuclear, lesões como necrose de fígado e baço, nefrite, miocardite, congestão e edema pulmonar, pneumonia, enterite, entre outras. Muitas vezes é possível visualizar o parasito nos órgãos infectados (HESSLER et al., 1971; ANDERSON & McCLURE, 1982; FRENKEL, 1989; CUNNINGHAM et al., 1992; DIETZ et al., 1997).

CASSAMAGNAGHI e colaboradores (1952, 1977) isolaram *T. gondii* de canários (*Serinus canarius*) que morreram no Uruguai. No total, 15 aves de um plantel de 18, provenientes de um mesmo criadouro morreram dentro de um período de 15 dias. As aves afetadas apresentavam esplenomegalia, lesões necróticas em pulmões e baço, enterite e degeneração hepática. Em um mocho barrado (*Strix varia*) proveniente do Canadá, que veio a óbito 16 dias após a colisão com um carro, foram encontradas durante o exame necroscópico, áreas de lesões necróticas multifocais cercadas por infiltrado inflamatório no fígado. Taquizoítas foram visualizados nas lesões e o diagnóstico foi confirmado imunoistoquimicamente (MIKAELIAN et al., 1997). Em perdizes experimentalmente infectadas foi encontrado esplenomegalia, hepatomegalia, congestão gastrintestinal e o intestino delgado apresentava-se edematoso com conteúdo amarelo claro (MARTÍNEZ-CARRASCO et al., 2005).

## 2.6. Toxoplasmose

*T. gondii* é responsável pela zoonose conhecida por toxoplasmose. Estudos sorológicos em humanos indicam que de 20 a 90% da população adulta encontra-se infectada por *T. gondii* (HANDMAN, 1980). No Brasil, em média 60% das mulheres adultas apresentaram sorologia positiva para o parasito (NETO, 1995).

A infecção geralmente é assintomática, sendo a toxoplasmose aguda e a infecção em indivíduos imunocomprometidos as formas mais graves da doença. Em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a toxoplasmose é a mais comum causa de lesões cerebrais e desenvolve em aproximadamente um terço dos pacientes soro-positivos (SHARMA, 1990). Não é conhecida a proporção do total de casos em que a infecção é assintomática, mas provavelmente varia de acordo com a linhagem do parasito (HALL, 1992).

A virulência de *T. gondii* é fortemente influenciada pelo genótipo do parasito. Embora as amostras de *T. gondii* sejam geneticamente muito similares, elas são divididas em três linhagens clonais distintas baseadas no polimorfismo do *locus* SAG2 (HOWE & SIBLEY, 1995; MORDUE et al., 2001; ROBBEN et al., 2004; SIBLEY & BOOTHROYD, 1992). Apesar da limitada diversidade genética, estas três linhagens manifestam diferentes níveis de virulência em camundongos (ROBBEN et al., 2004). A linhagem I é altamente virulenta para camundongos, tendo uma dose letal com um único parasito viável e está freqüentemente associada à toxoplasmose ocular e à toxoplasmose congênita severa, sugerindo que essa linhagem também seja mais patogênica para o homem (MORDUE et al., 2001). As linhagens do tipo II e III são menos virulentas, resultando em infecções controladas que persistem cronicamente e o surgimento da infecção depende do genótipo do hospedeiro (MORDUE et al., 2001; ROBBEN et al., 2004). No hemisfério Norte, o tipo II é o mais prevalente nos animais e está mais comumente associada com a toxoplasmose humana (HOWE & SIBLEY, 1995; MORDUE et al., 2001; ROBBEN et al., 2004). No Brasil, diversos estudos mostram uma maior prevalência dos tipos I e III (DUBEY et al., 2003a; BUBEY et al., 2003b; DUBEY et al., 2006; BRANDÃO et al., 2006).

## **2.7. Infecção por *T. gondii* em animais selvagens**

A natureza versátil de *T. gondii* tem sido bem documentada (DRESSEN, 1990). Quase todas as espécies de animais são susceptíveis a *T. gondii* e existem variadas taxas de soropositividade e sinais clínicos de toxoplasmose em diferentes hospedeiros (DUBEY; BEATTIE, 1988). Animais domésticos como cães, gatos, eqüinos e bovinos



apresentam evidências de sorologia positiva para *T. gondii*, assim como diversas espécies de animais selvagens (DUBEY & BEATTIE, 1988; DRESSEN, 1990).

Felinos domésticos e selvagens são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos no ciclo de *T. gondii* (DUBEY & BEATTIE, 1988). O processo de transmissão entre animais selvagens foi pouco estudado (HUMPHREYS et al., 1995; LINDSAY et al., 1991). SMITH e FRENKEL (1995) sugerem a hipótese de que a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em carnívoros seja maior que em onívoros, e esta por sua vez ser maior que em herbívoros, pois o hábito alimentar de carnívoros e onívoros expõe esses animais ao risco de contato com cistos teciduais do parasito.

No Brasil, SOGORB e colaboradores (1977) examinaram 10 espécies de mamíferos quanto à presença de anticorpos anti-*T. gondii* usando o teste Sabin-Feldman, o qual foi positivo para nove espécies, porém apresentando baixa reatividade sorológica. Na Califórnia, uma prevalência de anticorpos de 7% foi reportada em Veado Orelhudo (*Odocoileus hemionus*) (CHOMEL et al., 1994). FERREIRA et al., (1997), no Brasil, observaram 27% de soropositividade em cervos do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e 12% de soropositivos em veados campeiros provenientes do pantanal e do Parque Nacional de Emas, respectivamente. DUBEY e colaboradores (1999) encontraram uma positividade de 59%, 75% e 86% respectivamente para coiote (*Canis latrans*), raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) e raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), no Meio-Oeste americano. Em 1999, BOUER e colaboradores reportaram um surto fatal de toxoplasmose em 3 macacos-barrigudo (*Lagothrix lagotricha*) de um Zoológico no Brasil, com o diagnóstico sendo confirmado por imunoistoquímica. Em áreas específicas do Alaska foi encontrado uma positividade de 9% para *Canis lupus* (ZARNKE et al., 2000). VITALIANO e colaboradores (2004) confirmaram que em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de cativeiro a prevalência de *T. gondii* é maior em adultos do que em jovens e filhotes, chegando a uma prevalência geral de 74,6% de animais positivos para o parasito. A prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em mamíferos aumenta de acordo com a idade, possivelmente devido a um maior tempo de exposição ao parasito (FRANTI et al., 1975).

## 2.8. Infecção por *T. gondii* em aves

Infecção por parasitos semelhantes ao *Toxoplasma* foi observada por CARINI (1911) em lâminas preparadas a partir de fígado e baço de um pombo. Inicialmente, estes parasitos encontrados em aves foram denominados de *T. columbae* (YAKIMOFF & KOHL-YAKIMOFF, 1912), *T. avium* (MARULLAZ, 1913) e *T. fulicae* (DE MELLO, 1935), de acordo com o hospedeiro comprometido. Posteriormente LEVINE (1977) designou todas as espécies de *Toxoplasma* que acometiam aves como sendo sinônimos de *Toxoplasma gondii*.

Em 1992 na República Tcheca, LITERAK e colaboradores, encontraram 81% de soropositividade em 123 gaviões de asa redonda (*Buteo buteo*) testados. Em outras espécies de aves de rapina, LINDSAY e colaboradores (1993) detectaram nos EUA 41,1% e 66,7% de soropositividade em 27 gaviões de cauda vermelha (*Buteo jamaicensis*) e 12 gaviões de ombro vermelho (*Buteo lineatus*), respectivamente. Em perus (*Meleagris galopavo*), QUIST e colaboradores (1995) nos EUA, verificaram 10% de soropositivos em 130 animais testados utilizando o teste de aglutinação modificado (MAT). Em pardais (*Passer domesticus*), LITERAK e colaboradores (1997) na República Tcheca, encontraram 2,3% de soropositividade em 227 pardais testados. DUBEY e colaboradores no Canadá, em 2000, relataram uma soropositividade para *T. gondii* em 2,9% de 973 avestruzes (*Struthio camelus*), utilizando MAT. Em 2005, HOVE & MUKARATIRWA, encontraram 48% de soropositividade em 50 avestruzes de cativeiro no Zimbábue.

Trabalhos recentes têm classificado isolados de *T. gondii* em três linhagens I, II e III (*apud* DUBEY et al., 2006). No Brasil, em estudos com galinhas, de 24 isolados de *T. gondii* provenientes da região Amazônica, 14 eram do tipo I e 10 do tipo III (DUBEY et al., 2006); no Rio de Janeiro, de 48 isolados 34 eram tipo I e 13 tipo III (DUBEY et al., 2003a); e de 13 isolados do Paraná, 7 eram do tipo I e 6 do tipo III (DUBEY et al., 2003b).

Dados experimentais indicam que aves predadoras (corujas e outros rapinantes) são resistentes a *T. gondii*. Infecções experimentais utilizando cistos teciduais de *T. gondii* foram realizadas por LINDSAY e colaboradores (1991) em três gaviões de cauda vermelha (*Buteo jamaicensis*) e por DUBEY e co-autores, (1992) em sete corujas (1 mocho orelhudo, *Bubo virginianus*; 3 mochos barrados, *Strix varia*; e 3 mochos orelhudos pequenos, *Asio otus*). Em ambos os experimentos os animais não apresentaram sinais clínicos. Trabalhos recentes de KAJEROVÁ e colaboradores (2003), e MARTINEZ-CARRASCO e colaboradores (2005) mostraram que periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e perdizes de perna vermelha (*Alectoris rufa*), respectivamente, são resistentes à manifestação clínica da infecção por *T. gondii*, embora tenha havido a detecção de anticorpos específicos e a confirmação da presença do parasito em tecidos através de bioensaio em camundongos. MINEO et al. (2004) detectaram pela reação de imunofluorescência indireta, anticorpos anti-*T. gondii* em pombos (*Columba livia*) experimentalmente infectados durante 45 dias. As aves inoculadas demonstraram reatividade sorológica ao parasito aos 5 dias pós-infecção (dpi), obtendo maior título aos 10 dpi (1:10240).

Pombos portadores de *T. gondii* apresentavam anorexia, prostração, emagrecimento e conjuntivite com exsudato, do qual foi isolado esse organismo. No quadro final foram observadas convulsão e morte (CARINI, 1911; REIS & NÓBREGA, 1936). Em diversos países, entre eles Austrália e Nova Zelândia, foram descritos em canários (*Serinus canarius*) acometidos por toxoplasmose grave, um sinal clínico incomum, a cegueira (VICKERS et al., 1992). As aves apresentavam exsudato caseoso nas pálpebras, e em alguns casos a perda do globo ocular.

Algumas espécies ou mesmo raças de pombos podem ser mais susceptíveis à toxoplasmose clínica do que outras (JOHNSON, 1943). Um pingüim (*Eudyptula minor*) proveniente da Tasmânia veio a óbito após três dias de anorexia e diarreia. Ao exame necroscópico foram encontrados focos de descoloração nos parênquimas de baço e fígado, e a presença de taquizoítas de *T. gondii* foi confirmada por meio de imunistoquímica (MASON et al., 1991). Taquizoítas de *T. gondii* foram encontrados,

através de imunistoquímica, no miocárdio de uma águia careca (*Haliaetus leucocephalus*) que veio a óbito por miocardite necrosante (SZABO et al., 2004).

## 2.9. Diagnóstico

A demonstração da presença de *T. gondii* no hospedeiro, ou o isolamento dos parasitos mediante inoculação do material suspeito em animais de laboratório, constituem as principais técnicas parasitológicas de diagnóstico (REY, 2001). Entretanto, tais técnicas apresentam sérias limitações como baixa soropositividade, diferença na susceptibilidade dos animais a diferentes cepas, necessidade de longo tempo para confirmação do diagnóstico, além de dificuldades técnicas impedindo sua ampla aplicação.

Devido às limitações e dificuldades inerentes às técnicas parasitárias, os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*.

O teste de SABIN-FELDMAN (1948) foi o primeiro teste sorológico de boa sensibilidade e especificidade desenvolvido para o diagnóstico da toxoplasmose, porém pela dificuldade na sua realização e por exigir o uso de taquizoítas vivos, o mesmo foi substituído por outras provas imunológicas (WILSON et al., 1990; STOVER, 1993).

As técnicas de aglutinação em látex (LAT) e técnica de aglutinação modificada (MAT – DUBEY & DESMONTS, 1987), por apresentarem alta sensibilidade e não necessitarem de conjugados espécie-específicos são muito utilizadas para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em animais selvagens.

Outras técnicas como a hemaglutinação indireta, introduzida por JACOBS & LUNDE (1957) e a aglutinação direta, por FULTON & TURK (1959) foram propostas para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é um teste amplamente utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose (KELEN et al., 1962; CAMARGO, 1964). O antígeno utilizado é constituído por taquizoítas formolizados fixados em uma lâmina. A utilização de conjugados fluorescentes espécie-específicos resulta em fluorescência do parasito na presença de anticorpos específicos. Os resultados obtidos com a RIFI são

comparáveis àqueles encontrados pelo teste Sabin-Feldman. A maior desvantagem é a necessidade de um microscópio equipado para fluorescência com epi-iluminação para visualizar os parasitos fluorescentes.

As reações imunoenzimáticas são provavelmente as mais utilizadas atualmente em ensaios imunológicos e têm sido consideradas altamente sensíveis como os métodos sorológicos. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) introduzido por VOLLER et al. (1976) baseia-se na reação de soros testes com antígenos sensibilizados em placas de microtitulação. O anticorpo ligado é demonstrado pela adição de anti-imunoglobulina marcada com enzima seguido por ensaio da reação da enzima com seu substrato. Esta técnica além de apresentar alta sensibilidade e especificidade, possibilita trabalhar com quantidades variadas de amostras. A maior desvantagem do ELISA é a necessidade de espectrofotômetro de placa para leitura objetiva da reação.

Dados sobre a sensibilidade e especificidade sugerem que a PCR – reação em cadeia da polimerase – (STILES et al., 1996) pode ser extremamente útil para o diagnóstico da toxoplasmose em medicina veterinária e humana. Contudo, a PCR tem a desvantagem de demarcar positividade sem estabelecer relação com a atividade da doença.

A imunoistoquímica (LINDSAY & DUBEY, 1989) utilizando anticorpos específicos para *T. gondii* é utilizada para confirmar o diagnóstico quando o parasito é encontrado em lesões ou apresenta-se na forma de cistos teciduais. A utilização de anticorpos policlonais que ligam-se ao parasito como um todo são mais eficazes que os anticorpos monoclonais no diagnóstico imunoistoquímico da toxoplasmose (DUBEY, 2002).

#### **2.10. Carcará (*Caracara plancus*, MILLER, J. F., 1777)**

O carcará (Figura 2) é um animal pertencente ao filo Chordata, classe Aves, ordem Falconiformes, família Falconidae, gênero recentemente mudado de *Polyborus* para *Caracara* e espécie *Caracara plancus* (CLEMENTS, 2000). O carcará é uma ave de rapina de cor predominante parda realçada por um penacho na cabeça de penas negras. O pescoço, o peito, a parte inferior da cauda e as pontas das asas são carijós.

É considerado um falcão de pernas e pescoço compridos. Plana ao meio dia em correntes térmicas, porém passa a maior parte do tempo no solo, onde caminha a passos largos como um galináceo. É freqüentemente visto pousando nas estradas e cercas. Pode atingir de 50 a 60 cm de comprimento, chegando a pesar em torno de 1 kg. Possui o bico em forma de gancho. O jovem, além de apresentar um colorido mais pálido, mostra a pele nua da face arroxeadada, enquanto que o adulto a tem vermelha, alterando-a para amarela quando excitado. Sua distribuição geográfica vai desde o extremo sul dos Estados Unidos, México até a América do Sul. É encontrado no Brasil em campos, cerrados, caatingas, à beira de rodovias e cidades, beiras de matas, manguezais, praias oceânicas e fluviais. É incomum no interior de florestas densas. Esta ave, que também é conhecida por vários outros nomes, tais como caracará, gavião de queimada, ou carancho é oportunista e possui hábitos generalistas alimentando-se principalmente de pintainhos e assemelhados, todos os tipos de pássaros, roedores, cobras, lagartos, insetos (besouros, gafanhotos, etc.), aranhas, minhocas, lesmas e outros invertebrados. É freqüentemente visto acompanhando tratores que estão arando a terra. Quando caça vertebrados, abate a presa com sucessivas bicadas na nuca, após a captura. Não despreza nem animais mortos, inclusive peixes, em início de decomposição e ainda come frutos como o fruto do dendê (*Elaeis guineensis*), grãos encontrados no chão e ovos. Esta ave consegue bom suprimento de alimento também dos restos de animais atropelados nas rodovias (SICK, 1997; SIGRIST, 2006). O carcará acompanha a expansão da população humana se beneficiando de suas ações, criando assim uma relação muito próxima.



Figura 2: Foto de um Carcará (*Caracara plancus*).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a susceptibilidade, resposta imune humoral, as alterações anatomopatológicas e a presença do parasito em diversos tecidos de carcarás experimentalmente infectados com amostra ME49 de *Toxoplasma gondii*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Verificar as possíveis manifestações clínicas das aves durante o período experimental
- Avaliar a resposta imune humoral (anticorpos da classe IgG) anti-*T. gondii*.
- Analisar as aves quanto ao desenvolvimento de lesões anatomopatológicas e presença de *T. gondii* em diversos tecidos.



## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Aves**

Um total de oito carcarás provenientes de vida livre e com ferimentos foram trazidos ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, UNESP/Jaboticabal, para receber atendimento médico. Os animais foram mantidos no Ambulatório de Animais Silvestres do mesmo hospital até a total recuperação. Para serem utilizados no experimento foi obtida a licença do IBAMA nº 484/2005. Os soros das aves foram triados pela reação de imunofluorescência indireta para a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, na qual sete carcarás foram soronegativos. Os carcarás foram separados em dois grupos: G1, grupo infectado (cinco animais – aves 1, 4, 6, 7 e 8) e G2 grupo não infectado (dois animais – aves 2 e 5). Para controle positivo das reações (RIFI, IHQ e IFDT) foi utilizado amostras (soros e tecidos) obtidas de pombos experimentalmente infectados. As aves foram mantidas em recintos individuais suspensos do solo, tratadas com febendazol (33 mg/kg PO, dose única) e avaliadas clinicamente na fase de adaptação com duração de aproximadamente 30 dias. Os animais receberam alimentação específica (camundongos, pintinhos, carne e vísceras, ambas enriquecidas com cálcio) e água *ad libitum*. Todo projeto foi desenvolvido nas instalações da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Campus Jaboticabal/SP.

### **4.2. *Calomys callosus***

*Calomys callosus*, (Rodentia, Cricetidae, RENGGER 1830) é um roedor nativo da América do Sul amplamente distribuído no território brasileiro inclusive na região central do Brasil (Figura 3). Este mamífero é freqüentemente utilizado como modelo experimental para pesquisa, inclusive na manutenção da amostra ME49 de *T. gondii*. Foram utilizados 15 exemplares desse roedor (amostra Canabrava, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Eloísa A. V. Ferro, do Laboratório de Histologia, UFU, Uberlândia, MG).



Figura 3: Foto do roedor *Calomys callosus*

Esses roedores foram infectados pela via oral com macerado de cérebro de *Calomys* contendo cistos de *T. gondii* da amostra ME49 (60 cistos / 300 $\mu$ L salina estéril). A infecção nos roedores foi comprovada pela soroconversão dos animais detectada pelo teste ELISA seguindo a técnica descrita por FAVORETO-JUNIOR et al., (1998), no Laboratório de Imunologia da UFU. Os roedores foram mantidos em caixas recebendo alimentação (ração para roedores) e água *ad libitum* durante aproximadamente 45 dias após a infecção, quando eles foram abatidos e fornecidos como alimentação e fonte de infecção para as aves do grupo experimental.

#### **4.3. Infecção Experimental e colheita de material**

O grupo experimental foi alimentado durante três dias consecutivos com roedores *Calomys callosus* previamente infectados pela amostra ME49 de *T. gondii*. Cada ave do grupo G1 recebeu um roedor recém-abatido por dia. As colheitas de sangue foram realizadas antes da infecção (D0) e no 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 35<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup>, 55<sup>o</sup>, 68<sup>o</sup> dia pós-infecção (dpi). Nesses dias também foi realizado o exame clínico,

que consistia na observação do estado nutricional (avaliação da musculatura peitoral), do grau de hidratação, do aspecto das mucosas, do estado geral (presença de lesões, ectoparasitas, qualidade do empenamento e estado de atenção), além de aferir a temperatura (°C) e peso (g) das aves. Em cada colheita foi obtido aproximadamente 1,0 mL de sangue por punção da veia jugular ou da veia braquial. As amostras de sangue foram mantidas à temperatura ambiente para retração do coágulo e então centrifugadas a 300g por 10 minutos. Um dia antes da infecção e aos 14, 45 e 68 dpi o volume de sangue colhido foi de 2,5 mL, sendo uma parte adicionado de EDTA, para a realização de hemograma e a outra parte utilizada para obtenção de soro. As amostras de soro obtidas foram armazenadas em frascos identificados a -20°C até a realização dos testes sorológicos. Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Veterinária sob responsabilidade do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari. Aos 68 dpi as aves foram submetidas à eutanásia e em seguida realizado o exame necroscópico.

#### **4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

*Preparo do Antígeno:* Taquizoítas de *T. gondii* foram obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente inoculados com a amostra RH de *T. gondii* (CAMARGO, 1964). Após centrifugação (300 x g) por 10 minutos, o sedimento foi lavado por duas vezes em solução salina tamponada com fosfatos a 0,01M, pH 7,2 (PBS) por 10 minutos e, em seguida, tratado com PBS adicionado de formol a 1% durante 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante. Após centrifugação (300 x g) durante 1 minuto, o sedimento foi descartado, e o sobrenadante novamente centrifugado por 10 minutos. O sedimento foi lavado com PBS por duas vezes durante 10 minutos e, finalmente, ressuspenso em água destilada estéril até obter uma concentração de 20 a 30 parasitos por campo em microscópio óptico (objetiva 40x). Foram adicionadas 10 µL de suspensão parasitária em áreas demarcadas das lâminas de imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil). As lâminas com taquizoítas formolizados de *T. gondii* foram fixadas por

dessecação à temperatura ambiente, acondicionadas em lenços de papel e em papel alumínio, sendo posteriormente armazenadas em embalagens plásticas a -20°C.

*Teste e titulação das amostras de sangue de carcarás por RIFI:* A reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nos soros dos carcarás foi realizada conforme descrito por CAMARGO (1964), com modificações. O soro foi descongelado e diluído em salina tamponada na diluição inicial de 1/40 e volumes de 10 µL dos soros teste e de soros controle positivo (soros de pombos experimentalmente infectados) e negativo (carcarás não infectados – G2) foram colocados sobre lâminas contendo substrato antigênico. Após um período de 45 minutos de incubação a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas por três vezes em PBS. Em seguida, foi adicionado 10 µL do conjugado fluorescente heterólogo (anti-IgG galinha/FITC – Isotiocianato de fluoresceína, Sigma Chemical Company, St. Luis, USA) na diluição 1/50 em PBS/Azul de Evans 0,01%. As lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 45 minutos e procedeu-se a nova série de lavagens como anteriormente descrito. As lâminas foram montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 8,5) e observadas em microscópio equipado para fluorescência com epi-iluminação (Olympus Mod. BH2, Tokyo, Japão). Nas amostras reagentes foi realizada a titulação dupla seriada a partir da diluição de 1/40, sendo que as reações foram consideradas positivas quando os taquizoítas demonstraram completa marcação fluorescente em toda sua superfície. Taquizoítas mostrando padrão de fluorescência polar foram considerados como resultado negativo.

#### **4.5. Necropsia**

No 68º dia pós-infecção as aves foram submetidas à eutanásia, sendo inicialmente anestesiadas com Tiletamina/Zolazepan - Zoletil® (10mg/kg IM) e após estarem em plano anestésico profundo, foi administrado uma solução de KCl via IV. O exame *post-mortem* foi realizado com o intuito de avaliar as possíveis lesões macroscópicas causadas pela infecção por *T. gondii* e colher tecidos (cérebro, cerebelo, coração, fígado, músculo esquelético, baço, pulmão, pró-ventrículo, ventrículo, intestino

e olho) que foram devidamente fixados em formalina a 10% tamponada e mais tarde, emblocados em parafina, para a realização de exames histopatológicos e imunoistoquímicos posteriores.

#### **4.6. Exame Histopatológico**

Após a fixação do material (24 horas), este foi processado conforme rotina convencional de processamento histológico, com desidratação em diluições crescentes de álcoois e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica.

Com auxílio de micrótomo, foram realizados cortes de 3 µm de espessura, que foram dispostos em lâminas de vidro, as quais haviam sido tratadas anteriormente com Poly-L-Lisina (Sigma P-1399) diluída a 0,01% para manter o corte aderido à lâmina.

As lâminas com os cortes foram mantidas em estufa a 60°C por uma hora e submetidas à desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcoois. Os fragmentos nas lâminas foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina, para observação em microscópio óptico.

As lesões histológicas observadas foram classificadas em discreta<sup>(\*)</sup>, moderada<sup>(\*\*)</sup> e grave<sup>(\*\*\*)</sup>, de acordo com a gravidade das principais alterações teciduais (\*alteração comprometendo até 10% do fragmento examinado, \*\*alteração comprometendo até 40% do fragmento examinado, \*\*\*alteração comprometendo mais de 40% do fragmento examinado).

As lesões foram classificadas de acordo com sua localização em: focal (quando apenas um local do fragmento apresentou lesão), multifocal (quando as lesões se distribuíam por diversos locais) e difusa (quando a lesão comprometeu o fragmento todo).

#### **4.7. Reação de Imunoistoquímica (IHQ)**

Os cortes teciduais das aves inclusos em parafina (3 µm de espessura) foram incubadas a 60°C durante 15 minutos. Após esta etapa foram realizados os procedimentos de desparafinização e reidratação como acima descrito. As lâminas

foram então lavadas 3x durante 5 minutos com PBS pH 7,2. Para a realização da imunoistoquímica foi utilizado o kit Dakocytomation LSAB® + System-HRP (Dako North American Inc., Carpinteria, USA). Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 5% diluída em metanol (20 minutos), e um novo ciclo de lavagens com PBS. Foi realizada a recuperação antigênica utilizando o tampão Citrato pH 6,0 (4,2 g/2L PBS) em panela de pressão por 5 minutos. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram deixadas em repouso na temperatura ambiente por 20 minutos. O bloqueio da proteína inespecífica foi realizado de acordo com as instruções do fabricante por 10 minutos, utilizando o "Protein block" (Dako North American Inc., Carpinteria, USA) antecedendo a adição do anticorpo primário, IgG de camundongo anti-*Toxoplasma gondii*, incubado por 18 horas a 4°C na concentração de 1/3000. Após as lâminas alcançarem temperatura ambiente, realizou-se um novo ciclo de lavagens com PBS. O anticorpo secundário biotilado (Dako North American Inc., Carpinteria, USA) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante para cobrir o corte e incubado por 30 minutos, após os quais foi realizado um novo ciclo de lavagens utilizando o PBS. Depois da adição da strepto avidina/peroxidase (Dako North American Inc., Carpinteria, USA) o corte ficou incubando por 30 minutos, antes de ser novamente lavado com PBS. O cromógeno DAB (3,3'diaminobenzodine, Dako North American Inc., Carpinteria, USA) foi adicionado seguindo as recomendações do fabricante e em seguida realizada uma lavagem com água destilada. Após a adição da hematoxilina de Harris os cortes passaram por um ciclo de álcool + xilol, antes de serem montadas as lâminas. As lâminas foram lidas em microscópio óptico

#### **4.8. Reação de Imunofluorescência Direta em Tecidos (IFTD)**

A metodologia utilizada foi preconizada por MACHADO, (2006 - dados não publicados). Os cortes de parafina foram incubados a 60°C durante 30 minutos. Após esta etapa, foram realizados os procedimentos de desparafinização e reidratação como acima descrito. As lâminas foram então lavadas 3x durante 5 minutos com PBS. Foi realizada a recuperação antigênica utilizando o tampão citrato pH6,0 (4.2 g/2L PBS) em panela de pressão. Adicionou-se aos cortes 0,3 mL do anticorpo primário (soro de

camundongo positivo para *T. gondii*) diluído em PBS estéril na concentração de 1/200. Após um período de 2 horas de incubação a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas por três vezes em PBS. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL do conjugado fluorescente (anti-IgG de camundongo/FITC) na diluição 1/100 em PBS. As lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 2 horas e procedeu-se a nova série de lavagens como anteriormente descrito. As lâminas foram montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 8,5) e observadas em microscópio equipado para fluorescência com epi-iluminação (Olympus Mod. BH2, Tokyo, Japão).

#### **4.9. Bioensaio em camundongos**

Fragmentos de cérebro, musculatura esquelética e coração, uniformes em volume e peso, foram colhidos de forma asséptica no momento da necropsia das aves e macerados em PBS estéril, adicionado de solução antibacteriana e antifúngica (estreptomicina e anfotericina B), para inoculação intraperitoneal em camundongos BALB/c. Das aves infectadas foram colhidos fragmentos de todos os tecidos supracitados, com exceção da ave 6, da qual apenas músculo esquelético foi utilizado. Cada amostra de tecido macerado foi inoculada em três camundongos. Para este ensaio foram utilizados 39 camundongos, dos quais, três para o inóculo da ave 6 e o restante (36) para os inóculos das demais aves (9 camundongos por ave) . Após 30 dias da inoculação, foi colhido sangue do plexo retroorbital dos roedores para a realização da RIFI, com objetivo de verificar a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

#### **4.10. Pesquisa do DNA de *T. gondii* pela PCR**

Fragmentos de tecidos (músculo esquelético, coração, fígado, intestino delgado e pulmão) foram congelados a -20°C para posterior processamento e avaliação pela técnica da PCR (FUENTES et al., 1996).

##### **4.10.1. Extração do DNA das amostras de tecido das aves infectadas**

A extração do DNA das amostras de tecidos (músculo esquelético, coração, fígado, intestino delgado e pulmão) dos carcarás infectados foi realizada com o kit DNA

(QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen®, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **4.10.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A PCR foi realizada de acordo com a técnica descrita por FUENTES et al. (1996). Para a detecção do DNA de *Toxoplasma gondii*, um fragmento do gene B1 de uma seqüência de 194 pares de base (bps) foi ampliado, utilizando os iniciadores 5' - GGAACTGCATCCGTTTCATGAG-3' (B<sub>1</sub>) e 5'- TCTTTAAGAGTTCGTGGTC – 3' (B<sub>2</sub>).

As amostras a serem amplificadas foram previamente expostas a 95° C durante dois minutos. As reações foram realizadas com volume final de 50 µL com 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (primers), 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de mistura de dNTPs, uma concentração de DNA de 40 ng/ µL e Taq polimerase (1U/reacção). Em seguida foram realizados 35 ciclos de amplificação em termociclador programado para temperaturas de 95° C por um minuto, 57° C por 30 segundos e 72° C por um minuto.

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

#### **4.10.3. Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR**

Alíquotas de 15 µL do material amplificado foram separadas por eletroforese (95 volts, 90 minutos de corrida em tampão Tris EDTA Ac. Bórico – TEB - [1X]) em géis de agarose na concentração de 2%, corados com brometo de etídeo. Posteriormente os géis foram fotografados com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta, a fim de identificar a presença, ou não, do fragmento 194 pb característica do gene B1 de *T. gondii* (FUENTES et al., 1996).

#### **4.11. Análise Estatística**

A análise dos dados hematológicos, temperatura e peso foi feita através da análise de variância para medidas repetidas. O estudo da normalidade dos resíduos foi realizado para atender uma das pressuposições para análise de variância. Para a



comparação das médias foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Sinais clínicos**

Quanto à avaliação do estado nutricional, grau de hidratação, aspecto das mucosas e estado geral das aves não houve alterações dignas de nota durante o período experimental. O peso (g) das aves não variou entre os grupos infectados e não infectados. O peso (média  $\pm$  desvio padrão) das aves infectadas e não infectadas foi de  $1045,25 \pm 133,16$  g e  $1005,88 \pm 61,86$  g respectivamente ( $P < 0,05$ ). A temperatura média dos animais também não variou significativamente frente os grupos G1 e G2, sendo de  $41,69 \pm 0,39$  e  $42,30 \pm 0,23$ , respectivamente. As variações médias de peso e temperatura comparando ambos os grupos durante o período experimental encontram-se na Figura 4 e na Figura 5, respectivamente.

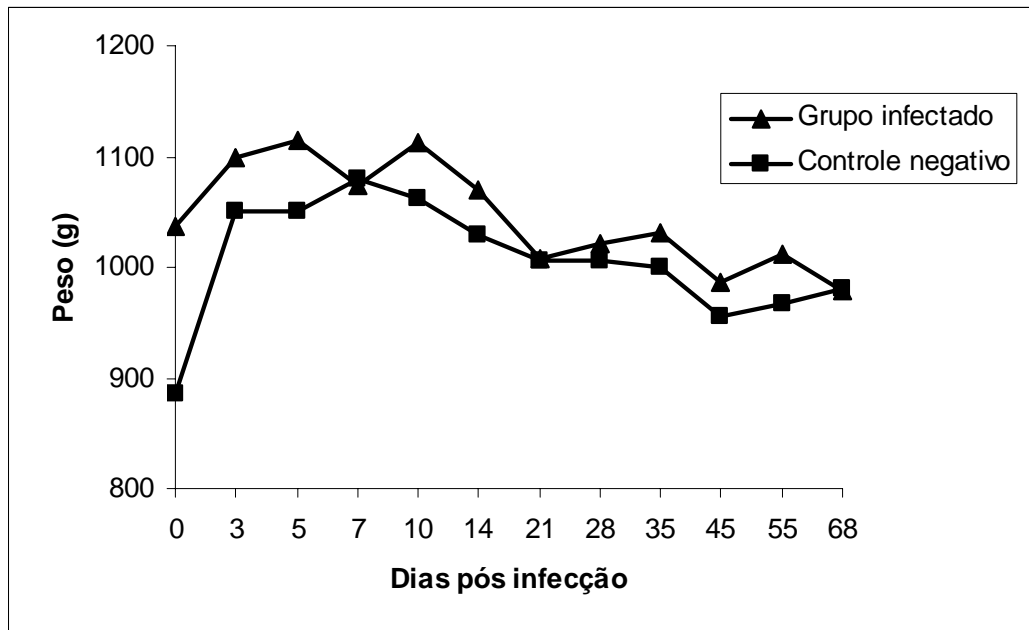


Figura 4: Variação do peso (g) dos carcarás infectados com *T. gondii* e das aves do grupo controle durante o período experimental.

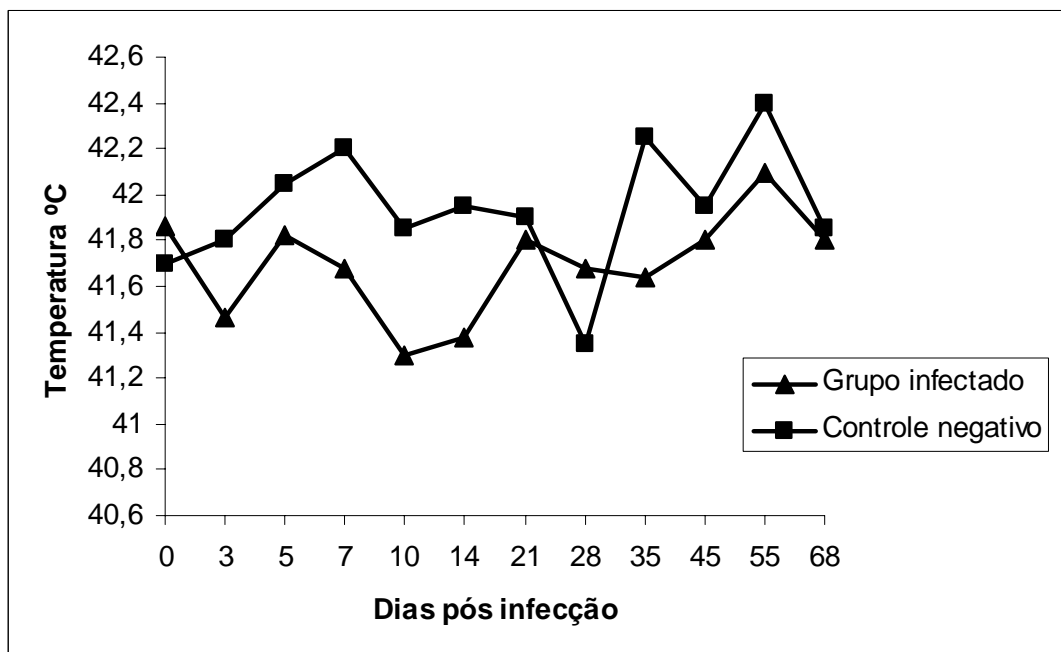


Figura 5: Variação da temperatura (°C) dos carcarás infectados com *T. gondii* e das aves do grupo controle durante o período experimental.

## 5.2. Patologia clínica

Não houve alteração estatisticamente significativa nos parâmetros de hemograma das aves infectadas em relação as não infectadas ao longo do período experimental. Os valores médios dos parâmetros hematológicos das aves infectadas e não infectadas com seus respectivos desvios padrão estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros hematológicos dos carcarás infectados experimentalmente por *T. gondii* e não infectados, com os valores de referência encontrados na literatura.

	Aves infectadas (n = 5)	Aves não infectadas (n = 2)	Valores de Referência*
	Média ± D.P	Média ± D.P	Média ± D.P
<b>Hematócrito (%)</b>	46,10 ± 3,04	42,12 ± 4,25	48,6 ± 5,0
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	14,48 ± 1,14	13,10 ± 1,61	14,9 ± 1,6
<b>Hemácias (x 10<sup>6</sup>/μL)</b>	2,42 ± 0,31	2,30 ± 0,23	3,22 ± 0,69
<b>HCM (pg/cel)</b>	60,49 ± 7,78	57,12 ± 6,98	44,0 ± 14,2
<b>CHCM (g/dL)</b>	31,44 ± 1,85	31,05 ± 1,43	31,1 ± 4,8
<b>Leucócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	6796,00 ± 2011, 68	7123,75 ± 1835,58	7352,00 ± 3309,00
<b>Linfócitos (%)</b>	22,10 ± 6,83	18,12 ± 6,81	37,09 ± 27,13
<b>Heterófilos (%)</b>	72,90 ± 7,65	76,87 ± 6,53	51,71 ± 30,10
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,50 ± 0,76	0	2,29 ± 1,10
<b>Basófilos (%)</b>	0,30 ± 0,47	0,25 ± 0,46	2,59 ± 1,27
<b>Monócitos (%)</b>	4,35 ± 2,43	4,75 ± 2,31	11,61 ± 5.23

\* Os valores de referência foram obtidos no “International Species Information System (ISIS)”- [www.isis.org](http://www.isis.org)

## 5.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A soroconversão ocorreu a partir do sétimo dia pós-infecção, no qual duas aves (carcarás 1 e 7) das cinco infectadas se tornaram positivas para a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* até a diluição de 1/80. No 10º dia mais duas aves (4 e 8)

soroconverteram. No 14<sup>o</sup> dia pós-infecção foi possível detectar anticorpos para *T. gondii* na diluição de 1/40 na ave número 6, porém os níveis de anticorpo dessa ave se tornaram novamente indetectáveis até o 45<sup>o</sup> dia, data na qual a titulação foi de 160. Ao 14<sup>o</sup> dia, o carcará 8 apresentou o título máximo de 320, e após manteve o título de 160 constante até o final do período experimental. O carcará 7, apresentou picos máximos de 160 a 320 entre 10-55 dpi. À partir do 45<sup>o</sup> dia houve uma tendência de diminuição dos títulos, com exceção do carcará 8, o qual mostrou títulos constantes. No 68<sup>o</sup> dia, a ave 1 não apresentou mais níveis detectáveis de anticorpos. As aves não infectadas (G2) não apresentaram níveis detectáveis de anticorpos anti-*T. gondii* durante todo o período experimental.

As diluições finais de reatividade de anticorpos IgG anti-*T. gondii* obtidos das aves experimentalmente infectadas, em diferentes dias de infecção estão expressos na Tabela 2 e na figura 6. Imunofluorescência positiva representativa dos soros das aves infectadas é mostrada na figura 7, na qual pode-se observar fluorescência ao redor de todo o taquizoíta.

Tabela 2: Títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* obtidos pela reação de imunofluorescência indireta em amostras de soros dos carcarás experimentalmente infectados, ao longo do período experimental (68 dias).

<b>DPI*</b>	<b>Carcará 1</b>	<b>Carcará 4</b>	<b>Carcará 6</b>	<b>Carcará 7</b>	<b>Carcará 8</b>
<b>0</b>	0	0	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0	0	0
<b>5</b>	0	0	0	0	0
<b>7</b>	1/80	0	0	1/80	0
<b>10</b>	1/160	1/40	0	1/640	1/160
<b>14</b>	1/320	1/80	1/40	1/640	1/320
<b>21</b>	1/160	1/160	0	1/640	1/160
<b>28</b>	1/160	1/320	0	1/320	1/160
<b>35</b>	1/80	1/160	0	1/640	1/160
<b>45</b>	1/40	1/160	1/160	1/640	1/160
<b>55</b>	1/40	1/160	1/160	1/320	1/160
<b>68</b>	0	1/40	1/80	1/160	1/160

\*DPI: Dias pós-infecção

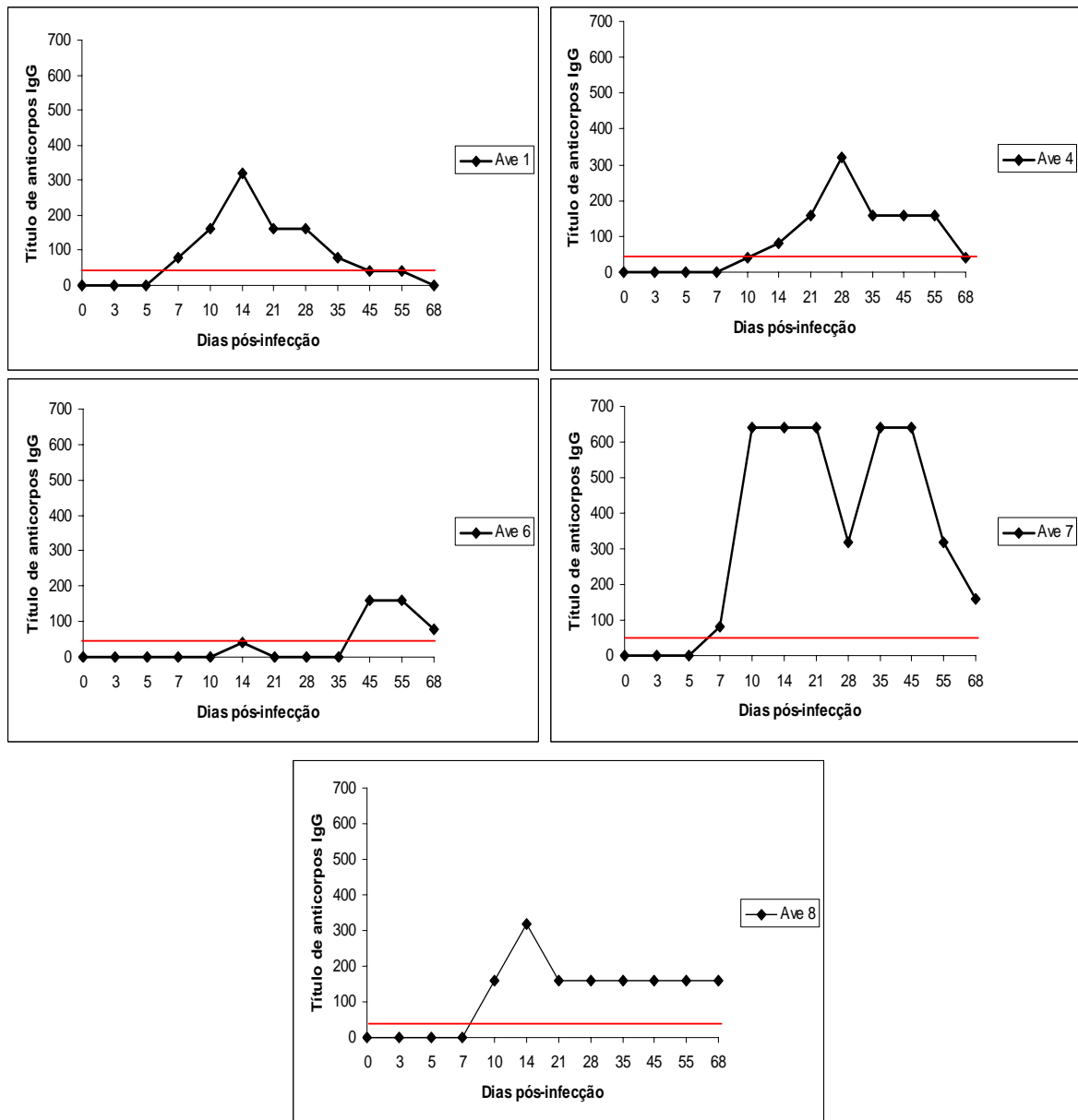


Figura 6: Cinética da resposta imune humoral em carcarás experimentalmente infectados (aves 1, 4, 6, 7 e 8) com *T. gondii*, por meio da reação de imunofluorescência indireta. A linha vermelha (título 40) representa o ponto de corte.

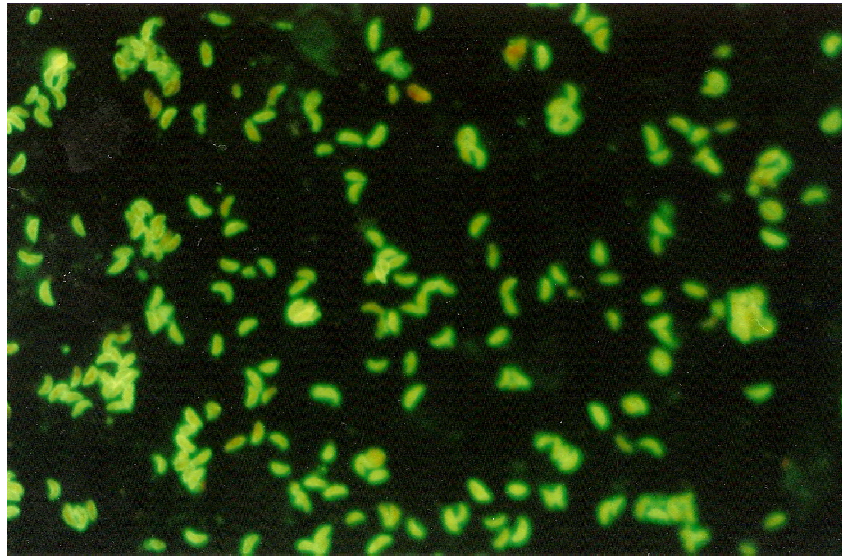


Figura 7: Imunofluorescência positiva para *T. gondii* representativa dos soros das aves infectadas. Observar fluorescência ao redor de todo o parasito, objetiva 40 x.

#### 5.4. Exame Necroscópico

Nenhum dos animais infectados morreu naturalmente da doença. Todas as aves foram submetidas à eutanásia a partir do 68 dias de período experimental.

Ao exame necroscópico, os rins de uma das aves não infectadas (carcará 2) apresentavam-se com aspecto nodular. A outra ave não infectada (carcará 5) apresentou o baço aumentado de volume e com manchas claras de 1 a 2 mm de diâmetro e inúmeras lesões puntiformes distribuídas pelo órgão.

Em uma das aves infectadas (carcará 7) observou-se dilatação acentuada de porções de alças do intestino delgado, sendo que a parede do mesmo apresentava-se de coloração marrom escura (Figura 8). Uma outra ave infectada (carcará 8) apresentou edema e áreas hemorrágicas em pulmões (Figura 9), apresentando ainda manchas enegrecidas no baço (Figura 10). Nas outras quatro aves do grupo experimental não foi encontrada nenhuma outra alteração.



Figura 8: Foto de intestino delgado da ave 7 (grupo infectado – G1), apresentando dilatação acentuada de porções de alças.

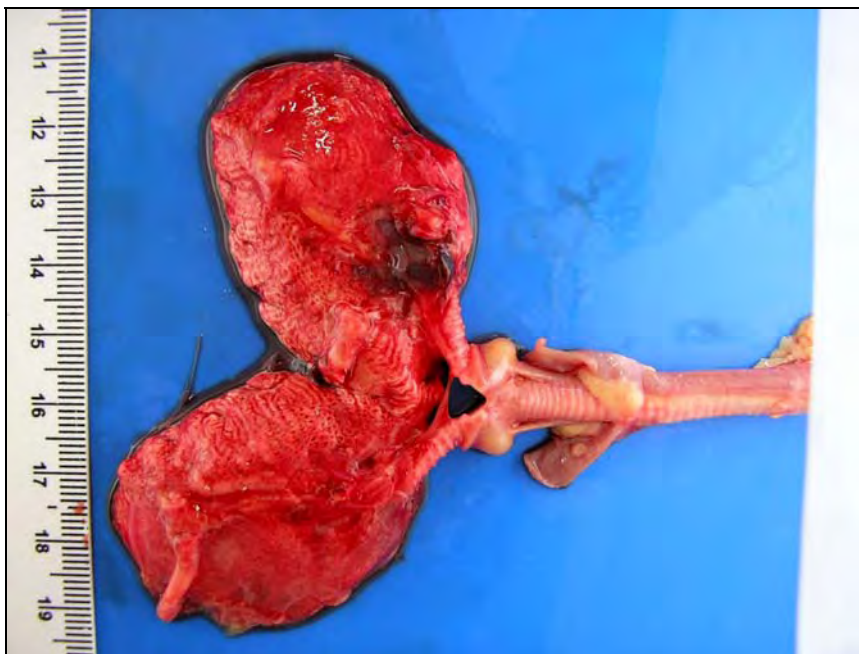


Figura 9: Foto de pulmão da ave 8 (grupo infectado – G1), apresentando áreas de hemorragia.





Figura 10: Foto de baço da ave 8 (grupo infectado – G1), com manchas enegrecidas.

### 5.5. Exame Histopatológico

No exame histopatológico, as aves infectadas e não infectadas apresentaram em todas as porções do intestino delgado a presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso em mucosa variando de discreto a moderado, sendo discreto nos carcarás não infectados e moderado nos infectados. Também foi possível observar nos pulmões de todas as aves congestão acentuada. Nas aves infectadas, além dos achados supracitados, foi possível observar lesões em coração, pulmão, baço, fígado, esôfago, pró-ventrículo e rim. Nas aves não infectadas também foi possível observar lesões em pulmão, rim, esôfago, pró-ventrículo e a presença de um cisto tecidual em músculo esquelético. Nos demais órgãos não foram encontradas alterações dignas de nota. Os achados histopatológicos e as respectivas aves nas quais foram encontrados estão apresentados na tabela 3.



## Continuação Tabela 3

Órgão	Aves infectadas					Aves não infectadas				
	Ave 1	Ave 4	Ave 6	Ave 7	Ave 8	Ave 2	Ave 5	Ave 8	Ave 2	Ave 5
<b>Rim</b>	Degeneração acentuada dos túbulos	_____	_____	Congestão	Hemorragia intersticial	Congestão	_____	Degeneração de túbulos	Congestão	_____
<b>Pulmão</b>	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	_____	Congestão	Heterófilos	Congestão
<b>Baço</b>	_____	_____	_____	Hemossiderose	_____	_____	_____	_____	Macrófagos	_____
<b>Coração</b>	_____	_____	_____	I.I.M.N discreto, multifocal em miocárdio	_____	_____	_____	_____	Bactérias	_____
<b>Músculo</b>	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	Cisto
<b>Esquelético</b>	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	tecidual
I.I.M.N: Infiltrado Inflamatório Mononuclear										

### 5.6. Imunoistoquímica (IHQ)

A presença de *T. gondii* foi detectada por meio de imunoistoquímica (Figura 11) nos carcarás experimentalmente infectados e não infectados nos seguintes órgãos: Músculo esquelético, coração, SNC e intestino (Tabela 4). O controle negativo da reação encontra-se representado na figura 12.

Tabela 4: Aves e os respectivos órgãos onde *T. gondii* foi encontrado pela Reação de Imunoistoquímica.

		Infectados			Não infectados	
Ave 1	Ave 4	Ave 6	Ave 7	Ave 8	Ave 2	Ave 5
—	—	Músculo	Músculo	Músculo	Músculo	—
—	Coração	—	—	—	—	—
SNC	—	SNC	SNC	SNC	SNC	SNC
—	—	Intestino	Intestino	—	—	—

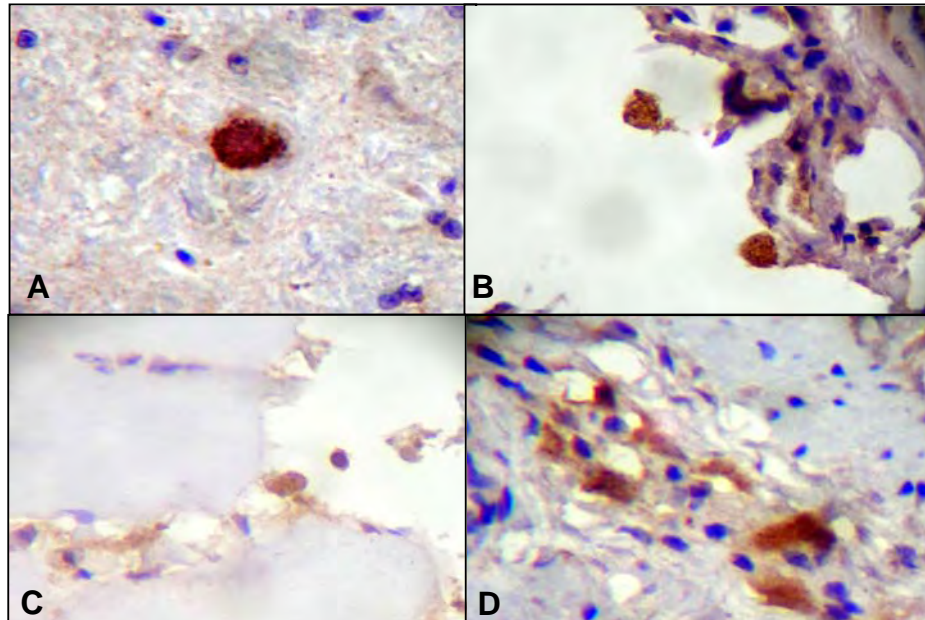


Figura11: Fotomicrografia de cortes de cérebro (A), coração (B), músculo esquelético (C) e intestino (D), mostrando a presença de *T. gondii* pela técnica de Imunoistoquímica – Objetiva 40x.

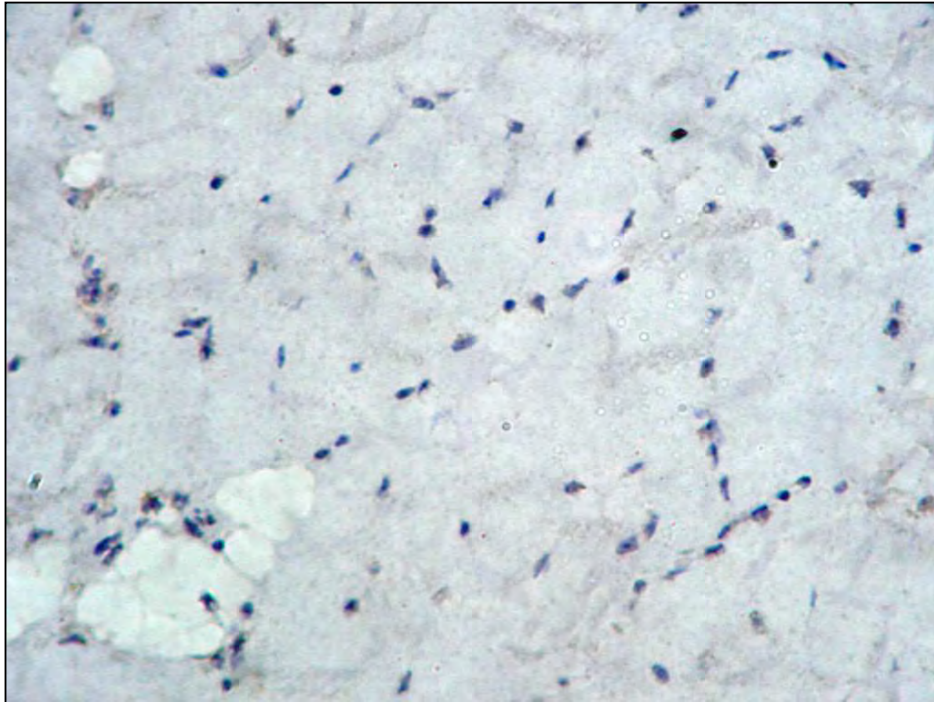


Figura 12: Fotomicrografia de corte de músculo esquelético de ave controle negativo para presença de *T. gondii* pela técnica de imunohistoquímica - Objetiva 40x.

### 5.7. Reação de Imunofluorescência Direta em Tecidos (IFDT)

A presença de *T. gondii* foi detectada pela reação de imunofluorescência direta em tecidos (Figura 13) nos carcarás experimentalmente infectados e não infectados nos seguintes órgãos: Músculo esquelético, fígado, coração, SNC, rim, esôfago, ventrículo, pró-ventrículo (P.V) e intestino (Tabela 5). O controle negativo da reação encontra-se representado na figura 14.

Tabela 5: Órgãos de aves infectadas e não infectadas, nos quais foi detectado *T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Direta em Tecidos.

Infectados					Não infectados	
Ave 1	Ave 4	Ave 6	Ave 7	Ave 8	Ave 2	Ave 5
Músculo	Músculo	Músculo	Músculo	Músculo	Músculo	Músculo
Fígado	Fígado	Fígado	Fígado	Fígado	Fígado	—
Coração	Coração	Coração	Coração	Coração	Coração	Coração
SNC	SNC	SNC	SNC	SNC	SNC	SNC
Rim	Rim	—	Rim	Rim	—	Rim
—	Esôfago	—	—	—	—	—
—	Ventrículo	—	—	—	—	—
—	P.V	—	—	—	—	P.V
Intestino	—	—	—	—	—	—

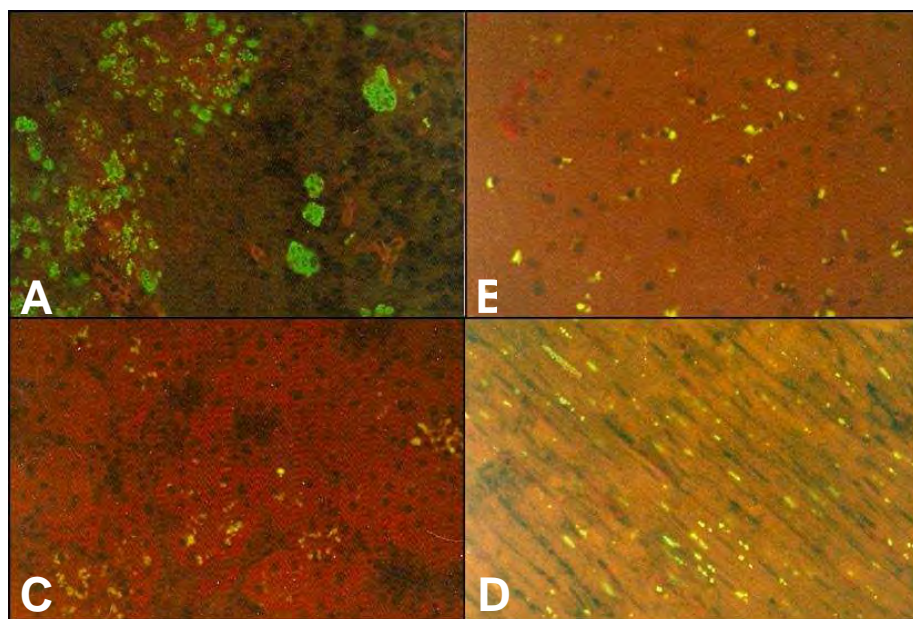


Figura13: Fotomicrografia de cortes de cérebro (A), fígado (B), rim (C) e músculo esquelético (D), mostrando a presença de *T. gondii* pela técnica de Imunofluorescência Direta em Tecidos – Objetiva 40x.



Figura 14: Fotomicrografia de corte de músculo esquelético de ave controle negativo para presença de *T. gondii* pela técnica de imunofluorescência direta em tecidos - Objetiva 40x.

### 5.8. Bioensaio em camundongos

Nenhum dos 39 camundongos utilizados neste bioensaio veio a óbito ou mesmo apresentou manifestações clínicas de toxoplasmose.

Por meio de testes sorológicos foi possível detectar anticorpos anti-*T. gondii* nos camundongos utilizados no bioensaio (Tabela 6). Um terço dos camundongos que foram infectados com macerado proveniente do coração das aves 1 e 7 foram positivos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* por meio de RIFI na diluição do soro de 1/16, confirmando a presença do parasito no coração dessas aves. Nos demais órgãos (músculo esquelético e cérebro) das aves infectadas (grupo G1) e no coração das aves 4 e 8, não foi possível demonstrar a presença do parasito através de bioensaio.

Tabela 6: Soroconversão de camundongos BALB/c inoculados intraperitonealmente com macerado dos órgãos (cérebro, coração e músculo esquelético) das aves infectadas por *T. gondii*.

Aves infectadas	Cérebro	Coração	Músculo esquelético
Ave 1	Negativo	Positivo	Negativo
Ave 4	Negativo	Negativo	Negativo
Ave 6	Não realizado	Não realizado	Negativo
Ave 7	Negativo	Positivo	Negativo
Ave 8	Negativo	Negativo	Negativo

### 5.9. Pesquisa do DNA de *T. gondii* pela PCR

Não foi possível, pela técnica de PCR, a detecção de *T. gondii* nos fragmentos de tecidos (músculo esquelético, coração, fígado, intestino delgado e pulmão) das aves infectadas e não infectadas utilizadas neste experimento. O controle positivo mostrou marcação de uma banda de 194 pares de base (Figura 15).

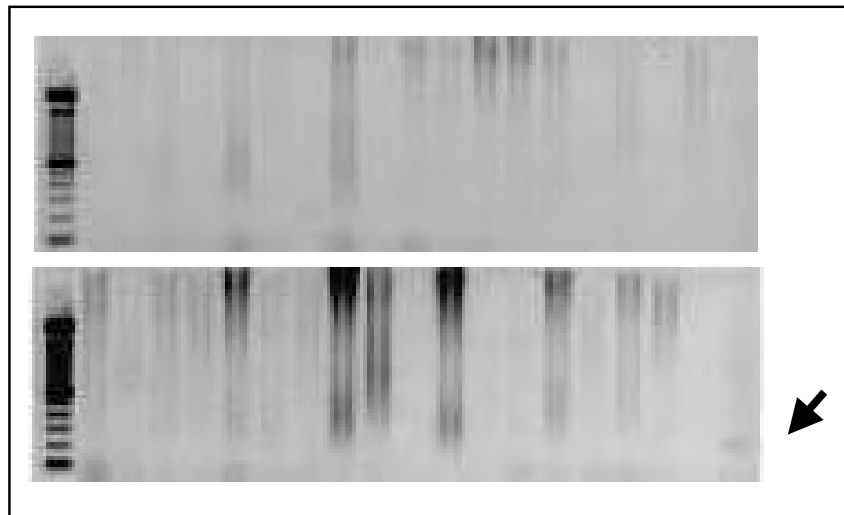


Figura 15: Gel de leitura da PCR das aves infectadas e não infectadas. A seta mostra a marcação de banda específica do controle positivo da reação.



## 6. DISCUSSÃO

Segundo SICK (1997) existem, no Brasil, mais de 1600 espécies de aves catalogadas, posicionando o país em terceiro lugar em número de espécies. Em estudos epidemiológicos, as aves podem ser utilizadas como sentinelas da contaminação do meio ambiente. Em estudos sorológicos sobre caracterização de isolados de *T. gondii*, DUBEY et al. (2006) utilizaram galinhas caipiras como hospedeiros indicadores de contaminação do solo por *T. gondii*, devido aos hábitos de ciscar e se alimentar no solo. Grande parte da dieta das aves de rapina é composta por roedores; desse modo, a prevalência de *T. gondii* nessas aves deve refletir a prevalência do parasito nas presas (roedores) que co-habitam a mesma região (LINDSAY et al, 1991). Entretanto, pouco é conhecido a respeito da susceptibilidade ou da resposta sorológica dos rapinantes a *T. gondii* (MILLER et al., 1972).

Os carcarás experimentalmente infectados no presente estudo não apresentaram sinais clínicos de toxoplasmose. O peso e a temperatura das aves variaram de forma aleatória sem nenhuma diferença significativa. Os outros parâmetros observados permaneceram normais durante todo o período experimental, consoante com os achados de LINDSAY et al. (1991) em gaviões de cauda vermelha (*Buteo jamaicensis*) experimentalmente infectados via oral com cistos teciduais de diferentes amostras de *T. gondii* (GT-1, PT-2, TS-2, ME-49, T-45, Aldrin, CT-1, WTD-1) e com os achados de KAJEROVÁ et al. (2003) em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) infectados oralmente com oocistos de *T. gondii* da amostra K21.

Por outro lado, KANETO e colaboradores (1997) em um estudo de infecção experimental, utilizando a amostra P de *T. gondii*, em frangos de corte observaram que as aves infectadas via oral com  $5 \times 10^2$  oocistos e com cistos teciduais não apresentaram sintomatologia clínica de toxoplasmose; porém, no mesmo estudo, os frangos que foram infectados pela mesma via com taquizoítas e oocistos em concentrações maiores ( $5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^4$ ) apresentaram temperatura retal significativamente mais alta do que as aves do grupo controle. DUBEY & HAMIR

(2002) descreveram letargia seguida de morte em periquitos australianos experimentalmente infectados via oral com oocistos da amostra VEG, utilizando diferentes doses infectantes. MARTINEZ-CARRASCO et al. (2005) relataram anorexia, letargia, presença de penas arrepiadas e diarreia amarelada em perdizes de perna vermelha (*Alectoris rufa*) experimentalmente infectadas via oral pela amostra OV51/95 de *T. gondii* em diferentes concentrações do parasito. Em ambos os estudos o aparecimento de sintomas foi dose dependente. Diversos estudos (KAJEROVÁ et al. 2003; DUBEY & HAMIR, 2002; KANETO et al., 1997) relataram que a gravidade dos sintomas clínicos está relacionada a quantidade do inóculo e virulência da amostra. Segundo SEDLÁK et al. (2000), em diferentes espécies de galináceos, a sintomatologia clínica pode variar com a espécie. Experimentalmente, a perdiz-grega (*Alectoris graeca*) apresentou maior susceptibilidade à infecção por *T. gondii* em relação a outras espécies de aves estudadas por DUBEY e colaboradores (1995), estudo no qual as perdizes infectadas com 10 oocistos da amostra de baixa virulência ME49 vieram a óbito de toxoplasmose. LINDSAY et al. (1991) e DUBEY et al. (1992) observaram, em estudos experimentais, que as aves de rapina em geral não apresentam sinais clínicos de toxoplasmose. Dessa forma é possível que a ausência de sintomas, observada no presente estudo, seja devido à baixa virulência da amostra ME49, a via de inoculação e a característica intrínseca da espécie.

Tal qual a sintomatologia clínica, os parâmetros hematológicos das aves de ambos os grupos (G1 e G2) antes da infecção e durante todo o período experimental estavam de acordo com os valores de referência para carcarás, obtidos no “International Species Inventory System” (ISIS; [www.isis.org](http://www.isis.org)) e não variaram significativamente. De forma semelhante, não houve diferenças expressivas entre os grupos, confirmando os achados de KAJEROVÁ et al. (2003) em periquitos australianos experimentalmente infectados via oral com oocistos da amostra K21 de *T. gondii*. Em contrapartida, KANETO et al. (1997) observaram diferenças significativas na concentração de hemoglobina e nas porcentagens de neutrófilos, linfócitos e monócitos na contagem diferencial de leucócitos em

frangos de corte experimentalmente infectados com altas doses de oocistos via oral e com taquizoítas pela via intravenosa da amostra P de *T. gondii*.

A soroconversão das aves experimentalmente infectadas ocorreu a partir do sétimo dpi, os picos iniciais na produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ocorreram entre 15 e 30 dpi sendo que em seguida houve uma tendência de diminuição de anticorpos circulantes, chegando a níveis indetectáveis no carcará 1 no 68º dpi. Confirmando o presente estudo MARTINEZ-CARRASCO et al. (2004) encontraram perfil semelhante na cinética da produção de anticorpos anti-*T. gondii* em perdizes (*A. rufa*) experimentalmente infectadas, porém utilizando o teste de aglutinação modificada (MAT) e teste de aglutinação em látex (LAT). SEDLÁK e colaboradores (2000), utilizando a RIFI, relataram a soroconversão a partir do 7º dpi em perdizes (*Perdix perdix*), chukars (*Alectoris chukar*), galinhas d'angola (*Numidas meleagris*) e perus (*Meleagris galopovo*) experimentalmente infectadas com *T. gondii*, porém em galinhas (*Gallus domesticus*) a soroconversão ocorreu somente a partir do 14º dpi. MINEO e colaboradores (2004), em pombos experimentalmente infectados, detectaram anticorpos anti-*T. gondii* por 45 dias, com picos de detecção no 10º dpi e a primeira detecção ocorrendo cinco dias após a infecção. KANETO et al. (1997) detectaram anticorpos anti-*T. gondii* em frangos de corte experimentalmente infectados do 5º ao 27º dpi. Assim como no presente estudo KAJEROVÁ et al. (2003) relataram o pico da produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* do 10º ao 30º dpi em periquitos australianos experimentalmente infectados. As aves foram consideradas positivas quando havia marcação específica na diluição do soro de 1/40, e as titulações foram feitas a partir de diluições seriadas. O carcará 7 atingiu a maior titulação (640), acompanhado de títulos máximos de 320 e 160 para as demais aves. SEDLÁK et al. (2000), também utilizando a RIFI, encontraram títulos mais altos (até 20480) em algumas espécies de galináceos experimentalmente infectados. Os títulos de anticorpos variam de acordo com os testes sorológicos realizados. MARTINEZ-CARRASCO et al. (2004) encontraram diferentes titulações, que variavam ao longo do experimento de forma independente, utilizando MAT e LAT. Devido à baixa

correlação entre resultados sorológicos e a infecção, a prevalência real de *T. gondii*, em aves, é provavelmente subestimada. MILLER et al. (1972), observaram que algumas espécies de aves apresentam baixos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, podendo chegar a níveis indetectáveis. Testes sorológicos para a detecção de *T. gondii* aplicados em aves podem ser relativamente insensíveis contrastando com o que ocorre nos mamíferos (FRENKEL, 1981).

Nenhuma das aves infectadas morreu naturalmente da doença e no momento da eutanásia todos os carcarás apresentavam bom estado corporal. Durante a realização do exame necroscópico foram encontradas lesões nas aves de ambos os grupos. Um carcará do grupo não infectado apresentou lesão nos rins (aspecto nodular) e o outro carcará, no baço (aumento de volume e manchas claras), provavelmente causadas por problemas anteriores ao presente estudo. No grupo infectado foi observado, em uma ave, dilatação acentuada de porções de alças do intestino delgado com coloração marrom escura e em outra ave, edema e áreas hemorrágicas em pulmões, apresentando ainda manchas enegrecidas no baço. Ratificando estes achados, KANETO e colaboradores (1997) não encontraram lesões macroscópicas sugestivas de infecção por *T. gondii* em frangos de corte experimentalmente infectados. MARTINEZ-CARRASCO et al. (2005) não encontraram lesões macroscópicas em perdizes (*A. rufa*) que sobreviveram à infecção experimental por *T. gondii*, porém as aves que vieram à óbito por toxoplasmose aguda apresentaram esplenomegalia, hepatomegalia e edema com a presença de conteúdo amarelado em intestino delgado. DUBEY & HAMIR (2002) encontraram em periquitos australianos experimentalmente infectados hiperemia em intestino delgado.

No presente estudo, as aves de ambos os grupos apresentaram no intestino delgado a presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso em mucosa variando de discreto a moderado, sendo discreto nos carcarás não infectados e moderado nos infectados. Também foi possível observar nos pulmões de todas as aves congestão acentuada. Nas aves infectadas, além dos achados supracitados, foi possível observar infiltrado inflamatório no coração, congestão no

pulmão, hemossiderose no baço e diversas lesões no fígado, esôfago, pró-ventrículo e rim. Nas aves não infectadas foi possível observar principalmente congestão no pulmão e nos rins e infiltrado inflamatório no esôfago e pró-ventrículo. Não foi possível relacionar as lesões encontradas nas aves infectadas com a infecção do parasito. Da mesma forma, KANETO et al. (1997) não observaram a presença do parasito, tampouco lesões histopatológicas sugestivas de infecção por *T. gondii* em frangos de corte experimentalmente infectados. LINDSAY e colaboradores (1991), no exame histopatológico, também não encontraram lesões ou cistos teciduais de *T. gondii* em gaviões da cauda vermelha experimentalmente infectados. Os achados microscópicos das aves infectadas não podem ser considerados patognomônicos da infecção, assim como os achados microscópicos das aves não infectadas, podem ser oriundos de outras infecções antigas.

No presente trabalho, não foi possível observar no exame histopatológico a presença do parasito (taquizoítas ou cistos teciduais) nos fragmentos dos diversos tecidos amostrados das aves infectadas. Diferentemente na literatura, DUBEY & HAMIR (2002) encontraram lesões em intestino delgado com a presença de inúmeros taquizoítas, além de lesões no fígado, cloaca, músculo esquelético, tecido conectivo periocular, medula óssea e cérebro de periquitos australianos experimentalmente infectados. SEDLÁK e colaboradores (2000), também encontraram lesões com a presença de taquizoítas em intestino delgado de perdizes (*P. perdix*) experimentalmente infectadas. MARTINEZ-CARRASCO et al. (2005) observaram lesões em intestino delgado, fígado e pulmão, além de cistos teciduais de *T. gondii* encontrados no cérebro de 70% das perdizes (*A. rufa*) infectadas.

Para visualização do parasito em fragmentos de diversos tecidos foram utilizadas as técnicas de imunoistoquímica (IHQ) e imunofluorescência direta em tecidos (IFDT). O parasito foi encontrado em pequena quantidade nos tecidos das aves do grupo infectado e nas aves do grupo controle em ambos os testes. DUBEY (2002) relata que técnica de imunoistoquímica utilizando anticorpos

específicos para *T. gondii* é uma ferramenta válida para o diagnóstico da infecção pelo parasito. Quanto à reação de imunofluorescência direta em tecidos, não existem relatos na literatura a respeito da sua utilização para o diagnóstico da toxoplasmose em aves. Neste trabalho, a IFDT mostrou ser uma técnica de alta sensibilidade para detecção de *T. gondii*, sendo capaz de detectar não só a presença de cistos teciduais, mas também de formas do parasito distribuídas difusamente em diversos fragmentos de tecidos. Segundo DUBEY et al. (1994 e 1995) e HOWERTH & RODENROTH (1985) em estudos experimentais e infecções naturais de *T. gondii* em aves, respectivamente, o parasito é mais facilmente apresentado na forma de inúmeros taquizoítas distribuídos nos tecidos do que na forma de cistos teciduais, dessa forma a IFDT poderá ser, possivelmente, uma valiosa ferramenta para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* em aves. Entretanto, esta técnica deve ser utilizada com cuidado, pois pode haver um certo grau de reatividade inespecífica em alguns órgãos.

Utilizando a imunistoquímica foi possível observar a presença do parasito em músculo esquelético, coração, SNC e intestino. Não foi possível detectar com segurança *T. gondii* quando o mesmo distribuía-se difusamente nos tecidos. SEDLÁK e colaboradores (2000), utilizando a imunistoquímica em fragmentos de diversos órgãos, foram capazes de detectar o parasito apenas no intestino delgado de uma perdiz experimentalmente infectada. Em contrapartida, DUBEY & HAMIR (2002), utilizando a imunistoquímica, observaram a presença do parasito em diversos tecidos de periquitos australianos experimentalmente infectados.

No presente estudo, o bioensaio em camundongos realizado com as amostras de cérebro, coração e músculo esquelético das aves infectadas experimentalmente por 68 dias confirmou a presença do parasito no coração de duas aves. Em um estudo de infecção experimental em gaviões da cauda vermelha, LINDSAY et al. (1991), utilizando o bioensaio, confirmaram a presença de *T. gondii* em cérebro, músculo esquelético, coração e em um "pool" de pró-ventrículo e ventrículo. KANETO e colaboradores (1997), utilizando a mesma técnica, observaram a presença do parasito em diversos tecidos de frangos de

corde experimentalmente infectados. SEDLÁK e colaboradores (2000), utilizando o bioensaio, comprovaram a presença de *T. gondii* em cérebro, fígado, baço, coração e músculo esquelético de várias espécies de galiformes experimentalmente infectados. No mesmo estudo foi possível observar uma correlação entre tempo de infecção e a prevalência de aves positivas no bioensaio. Entre aves submetidas à eutanásia aos sete dias pós-infecção a positividade era maior do que as submetidas aos 14 dpi, e ainda maior do que nas aves sacrificadas aos 21 dpi, sendo que a menor prevalência foi encontrada entre as aves submetidas à eutanásia aos 28 dpi. Esta correlação também foi observada por KAJEROVÁ et al. (2003) em um estudo com periquitos australianos experimentalmente infectados. Outro dado de suma importância observado por SEDLAK et al. (2000) foi que a positividade foi maior entre perdizes (*P. perdix*) do que entre galinhas, sendo as primeiras uma espécie com maior susceptibilidade a manifestações clínicas da doença. MARTINEZ-CARRASCO et al. (2005) evidenciaram a presença de *T. gondii* no pulmão, baço, fígado, rim, cérebro e olho de perdizes (*A. rufa*) infectadas. Em um estudo de infecção experimental em periquitos australianos, DUBEY & HAMIR (2002), relataram a detecção de *T. gondii* por meio do bioensaio em camundongos em tecidos de aves nas quais não foi possível detectar o parasito utilizando a imunistoquímica. Os resultados obtidos nesse estudo indicam baixa sensibilidade do bioensaio, e que esta pode estar relacionada ao tempo de infecção (68 dias) e à relativa resistência do carcará à toxoplasmose.

Os ensaios utilizados para detectar a presença do parasito nos diversos tecidos (IFTD, IHQ e bioensaio em camundongos) mostraram a presença do parasito mais frequentemente nos seguintes órgãos: músculo esquelético, coração e SNC. Dados estes, que confirmam os achados de LINDSAY et al. (1991) e DUBEY et al. (1992) em aves de rapina experimentalmente infectadas, nas quais o parasito se encontrava principalmente em músculo esquelético e coração; e com os achados de DUBEY & BEATTIE (1988) os quais mostraram o tropismo do parasito por tecido neural.

Atualmente, a PCR tem sido amplamente utilizada. Entretanto, a técnica da PCR para identificação de *T. gondii* muitas vezes ainda é insatisfatória, devido à falta de padronização e as variações na eficiência (MAHITTIKORN et al., 2005). No presente estudo, utilizando a PCR, não foi possível detectar *T. gondii* nos fragmentos de tecidos (músculo esquelético, coração, fígado, intestino delgado e pulmão) das aves utilizadas. SEDLÁK e colaboradores (2000), utilizando a PCR, conseguiram detectar *T. gondii* no sangue de galinhas experimentalmente infectadas no 7º dpi, porém não foi possível a detecção no 14º, 21º e 28º DPI. GARCIA et al. (2006) estudando a sensibilidade de diferentes metodologias de detecção do parasita em porcos experimentalmente infectados, reportaram a detecção de *T. gondii* pela PCR em diversos tecidos (cérebro, masseter, língua, diafragma e coração), porém a capacidade de detecção pela PCR foi sensivelmente inferior ao bioensaio em camundongos, dados que sugerem que a não detecção do parasito nas aves experimentalmente infectadas no presente estudo esteja relacionada a baixa carga parasitária nos tecidos observada no bioensaio, IFDT e IHQ.



## 7. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, por meio do delineamento experimental executado, as seguintes conclusões puderam ser obtidas:

- Devido à ausência de sinais clínicos, alterações hematológicas e baixa distribuição do parasito nos tecidos, a amostra ME49 de *T. gondii*, inoculada pela via oral não foi patogênica para os carcarás.
- A eficiência da infecção por *T. gondii* foi comprovada pela produção de anticorpos específicos detectados pela RIFI. A sorologia mostrou ser uma ferramenta útil, porém de aplicação temporária (detecção na fase aguda), devido à rápida queda dos títulos de anticorpos.
- A presença do parasito nos diversos tecidos das aves foi detectada pelo bioensaio em camundongos, pela IHQ e pela IFDT. Em todas as técnicas a detecção foi pequena, indicando uma baixa carga parasitária.
- No presente estudo, *T. gondii* não foi detectado nos tecidos amostrados pela PCR.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda., 2002, 544 p.

ADIE, J.R. Note on a parasite in the sparrow. **Indian Med. Gaz.** n. 43, p. 176–180, 1908.

AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. Toxoplasmosis – Congenital in Immunocompromised Patients: A Parallel. **Parasitology Today**, v. 9, n. 2, p. 61-63, 1993.

ANDERSON, D. C.; McCLURE, H. M. Acute Disseminated Fatal Toxoplasmosis in a Squirrel Monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 11, p. 1363-1366, 1982.

ARAGÃO, H.B. Observações sobre algumas hemogregarinas das aves. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 3, p. 54–64, 1911.

BLACK, M. W. & BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BOUER, A.; WERTHER, K.; CATÃO-DIAS, J. L.; NUNES, A. L. V. Outbreak of Toxoplasmosis in *Lagothrix lagotricha*. **Folia Primatol.** v. 70, p. 282-285, 1999.

BRANDAO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**. v. 13, n. 2, p. 143-149, 2006.

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

CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 4, p. 518–519, 1911.

CASSAMAGNAGHI, A.; BIANCHI BAZERQUE, A.; SCELZA, R.; FERRANDO, H. La toxoplasmosis. Su incorporación en la patología Uruguaya. Reconocimiento de dos cepas en nuestras aves domésticas. Su transmisión y carácter infeccioso para los mamíferos. **Boll. Ministerio de Agric. y Ganaderia Montevideo**, v. 33, p. 34–38, 1952.

CASSAMAGNAGHI, A.; BIANCHI BAZERQUE, A.; SCELZA, R.; FERRANDO, H. La toxoplasmosis. Su incorporación en la patología Uruguaya. **An. Fac. Veterinaria (Uruguay)**, v. 1, p. 27–47, 1977.

CLEMENTS, J., F. In: **Birds of the World, a Check List**. 5 ed., Ibis Publishing, 880 p., p. 49, 2000.

CHOMEL, B. B.; CARNICIU, M. L.; KASTEN, R. W.; CASTELLI, P. M.; WORK, T. M.; JESSUP, D. Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 51-59, 1994.

COSTA, A. J.; ARAÚJO, F. G.; COSTA, J. O.; LIMA, J. D.; NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 63, n. 02, p. 212-218, 1977.

CUNNINGHAM, A.A.; BUXTON, D.; THOMSON, K.M. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 107, p. 207-219, 1992.

DE MELLO, F. On a toxoplasmid of *Fulica atra* with special reference to a probable sexuality of agametes. **Proc. Indian Acad. Sci.**, v. 1, p. 705–709, 1935.

DIETZ, H. H.; HENRIKSEN, P.; BILLE-HANSEN, V.; HENRIKSEN, S.A. Toxoplasmosis in a colony of New World Monkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 299-304, 1997.

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

DOBOS-KOVÁCS, M.; MESZAROS, J.; PELLERDY, L.; BALSAL, A. Enzootische Toxoplasmose bei Kanguruhs (*Wallabia eugenii*). In: INTERNATIONALES SYMPOSIUM UBER DIE ERKRANKUNGEN DER ZOOTIERE, 16, 1974, Erfurt. **Proceedings...** p. 323-325

DUBEY, J. P.; SWAN, G. V.; FRENKEL, J. K. A. Simplified method for isolation of *T. gondii* from the feces of cats. **Journal of Parasitology**, v. 58, n. 05, p. 1055-1056, 1972.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 2, p. 166-170, 1986.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Vet. Clin. North Am: Small Anim. Pract.**, v. 17, n. 6, p. 1389-1405, 1987.

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

DUBEY, J. P.; PORTER, S. L.; TSENG, F.; SHEN S. K.; THULLIEZ, P. Induced toxoplasmosis in owls. **Journal of Zoological and Wildlife Medicine**, v. 23, p. 98–102, 1992.

DUBEY, J. P., RUFF, M. D., WILKINS, G. L., SHEN, S. K. & KWOK, O. C. H. Experimental toxoplasmosis in pheasants (*Phasianus colchicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 40–45, 1994.

DUBEY, J. P.; GOODWIN, M. A.; RUFF, M. D.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in chukar partridges (*Alectoris graeca*) **Avian Pathology**, v. 24, p. 95-107, 1995.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S., SPEER, C. A. Structure 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.; STORANDT, S. T.; KWOK, O. C.; THULLIEZ, P.; KAZACOS, K. R. *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally exposed wild coyotes, red foxes, and gray foxes and serologic diagnosis of Toxoplasmosis in red foxes fed *T. gondii* oocysts and tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 240-243, 1999.

DUBEY, J. P.; SCANDRETT, W. B.; KWOK, O. C. H.; GAJADHAR, A. A. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in ostriches (*Struthio camelus*). **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 623–624, 2000.

DUBEY, J. P.; ODENING, K. Toxoplasmosis and related infections. In: Samuel, B., Pybur, M., Kocan, A.M. (Eds.). **Parasitic Diseases of Wild Mammals**. Iowa State University Press, Ames, p. 478–519, 2001.

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

DUBEY, J. P. & HAMIR, A. N. Experimental toxoplasmosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 514-519, 2002.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; da SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocysts shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 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, n. 3, p. 229-234, 2003b.

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 from free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 36-40, 2006.

FAVORETO-JUNIOR, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A.O.; MINEO, J.R. Experimental Infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 103-107, 1998.

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

FRANTI, C. E.; CONNALLY, G. E.; RIEMANN, H. P.; BEHYMER, D. E.; RUPPANNER, R.; WILLADSEN, C. M. AND LONGHURST, W. A survey for *Toxoplasma gondii* antibodies in deer and other wildlife on a sheep range. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 167, p.565-568, 1975.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology, and immunity. IN: HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. (Eds.). *The coccidea*. Baltimore: University Park, 1973.

FRENKEL, J. K. False-negative serologic test for *Toxoplasma* in birds. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 952-953, 1981.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of Toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v. 4, n. 10, p. 273-278, 1988.

FRENKEL, J. K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p.230-233, 1989.

FULTON, J. D.; TURK, J. L. Direct agglutination tests for *Tooplasma gondii*. **Lancet**. .v 2, p. 1068-1069, 1959.

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.

HALL, S. M. Congenital toxoplasmosis. **B. M. J.**, v. 305, n. 6848, p. 291-297, 1992.

HESSLER, J. R.; WOODARD, J. C.; TUCEK, P. C. Lethal toxoplasmosis in a Woolly Monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, n. 11, p. 1588-1594, 1971.

HOVE, T. & MUKARATIRWA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostriches and wild game species from Zimbabwe. **Acta Trop.**, v. 94, n. 1, p. 49-53, 2005.

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

HOWERTH, E. W. & RODENROTH, N. Fatal systemic toxoplasmosis in wild turkey. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 21, p. 446–449, 1985.

HUMPHREYS, J. G.; STEWART, R. L.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of hunter-killed White-Tailed deer in Pennsylvania. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p.172-173, 1995.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comp. Immun. Microbiol. Infct. Dis.**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

JACOBS, L. & LUNDE M. N. A hemagglutination test for toxoplasmosis. **Journal of Parasitology**, n. 43, v. 3, p. 308-314, 1957.

JOHNSON, C. M. Immunological and epidemiological investigation under the direction of C.M. Johnson, protozoologist, **Annual Report of the Gorgas Memorial Laboratory**, p. 15–16, 1943.



KAJEROVÁ, V.; LITERÁK, I.; BÁRTOVÁ, E.; SEDLÁK, K. Experimental infection of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) with a low virulent K21 strain of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, n. 116, p. 297–304, 2003.

KANETO, C.N.; COSTA, A.J.; PAULILLO, A.C.; MORAES, F.R.; MURAKAMI, T.O.; MEIRELES, M.V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. **Veterinary Parasitology**, Lancaster, Pa., n. 69, p. 203-210, 1997.

KELEN, A. E.; AYLLON-CLEINDL, AND LABZOFFSKY, N. A. indirect fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. **Canadian Journal of Microbiology**. n. 8, p. 545-554, 1962.

LAPPIN, M. R.; GREENE C. E.; WINSTON, S.; TOLL, S. L.; EPSTEIN, M. E. Clinical feline toxoplasmosis. Serologic diagnosis and therapeutic management of 15 cases. **J. Vet. Internat. Med.**, v. 3, p. 139-143, 1989.

LAVERAN, A. Au sujet de l'hémtozoaire endoglobulaire de *Padra oryzivora*. **Comp. Rend. Soc. Biol.** Paris, n. 52, p. 19–20, 1900.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY; J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, n. 30, p. 11423–11428, 2006.

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

LINDSAY, D. S. & DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. *Toxoplasma gondii* infection in Red-Tailed hawks inoculated orally with tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 2, p.222-225, 1991.

LINDSAY, D. S.; SMITH, P. C.; HOERR, F. J.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 870-873, 1993.

LITERÁK, I.; HEJLÍEK, K.; NEZVAL, J.; FOLK, C. Incidence of *Toxoplasma gondii* in populations of wild birds in the Czech Republic. **Avian Pathology**, v. 21, p. 659–665, 1992.

LITERÁK, I.; PINOWSKI, J.; ANGER, M.; JUICOVÁ, Z.; KYU-HWANG, H.; ROMANOWSKI, J. *Toxoplasma gondii* antibodies in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*). **Avian Pathology**, v. 26, p. 823–827, 1997.

MAHITTIKORN, A.; WICKERT, H.; SUKTHANA, Y. Comparison of five DNA extraction methods and optimization of a b1 gene nested PCR (nPCR) for detection of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in mouse brain. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1377-1382, 2005.

MANWELL, R. D. Avian toxoplasmosis with invasion of the erythrocytes. **Journal of Parasitology**, v. 27, p. 245–251, 1941.

MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; ORTIZ, J. M.; BERNABÉ, A.; RUIZ DE YBÁÑEZ, M.R.; GARIJO, M.; ALONSO, F.D. Serologic response of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 143–149, 2004.

MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; BERNABÉ, A.; ORTIZ, J. M.; ALONSO, F.D. Experimental toxoplasmosis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 55-60, 2005.

MARULLAZ, M. Au sujet d'un toxoplasme des oiseaux. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 6, p. 323–326, 1913.

MASON, R. W.; HARTLEY, W. J.; DUBEY, J. P. Lethal Toxoplasmosis in a Little Penguin (*Eudyptula minor*) from Tasmania. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 328, 1991.

McLEOD, R.; MACK, D.; BOWN, C. *Toxoplasma gondii* - New advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v.72, p.109-121, 1991.

MIKAELIAN, I., DUBEY, J. P., MARTINEAU, D. Severe hepatitis resulting from toxoplasmosis in a barred owl (*Strix varia*) from Québec, Canada. **Avian Disease**, v. 41, p. 738–740, 1997.

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and birds. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect. Immunology**, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINEO, T. P. W.; MARCIANO, J. A.; CARRASCO, A. O. T.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Infecção experimental de pombos (*Columba livia*) com *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 218, 2004.

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; REGINA, M.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 167, p. 4574-4584, 2001.

NETO, V. A.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4 Ed. São Paulo: Sarvier, p. 154, 1995.

NICOLE, C & MANCEAUX, L. Sur une infection á corps de Leishman (ou organisms voisins) du *gondii*. **C. R. Acad. Sci.**, v. 147, p. 763, 1908.

OLIVEIRA, M. A. P.; SANTIAGO, H. C.; LISBOA, C. R.; CERAVOLLO, I. P.; TRINCHIERI, G.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. *Leishmania* sp: Comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and INF- $\gamma$  synthesis. **Exp. Parasitol.**, v. 95, p. 96-105, 2000.

PATTON, S. Toxoplasmosis in the zoological park. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1993, Saint Louis. **Proceedings...**p. 189-191.

PETRAK, M. & CARPENTER, J. Feline toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 146, n. 7, p. 728-734, 1965.

PFEFFERKORN, E. The Cell Biology of *Toxoplasma gondii*. IN: WYLER, D.J.(Ed.) “**Modern Parasite Biology: Cellular Immunological and Molecular Aspects**”, Freeman, New York, p. 26-50, 1990.

QUIST, C. F.; DUBEY, J. P.; LUTTRELL, M. P.; DAVIDSON, W. R. Toxoplasmosis in wild turkeys: a case report and serologic survey. **Journal of Wildlife Disease**, v. 31, p. 255–258, 1995.

REIS, J. & NÓBREGA, P. Toxoplasmose. Tratado de doenças das aves, **Proc. Ed. Inst. Biológico** (São Paulo), p. 302–306, 1936.

REY, L. IN: **Parasitologia**. 2 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 731p.

ROBBEN, P. M.; MORDUE, D. G.; TRUSCOTT, S. M.; KIYOSHI, T.; SHIZUO, A.; SIBLEY, L. D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **Immunology**, Oxford, v. 172, p. 3686-3694, 2004.

RUIZ, A. & FRENKEL, J. K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 1161–1166, 1980.

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

SEDLÁK, K.; LITERÁK, I.; VITULA, F.; BENÁK, J. High susceptibility of partridges (*Perdix perdix*) to toxoplasmosis compared with other gallinaceous birds. **Avian Pathology**, n. 29, p. 563–569, 2000.

SHARMA, S. D. Immunology of Toxoplasmosis. In: WYLER, D. J. (Ed). **Modern Parasite Biology-Cellular, Immunological and Molecular Aspects**, New York: W. H. Freeman, p. 184-199, 1990.

SIBLEY, L. D. & BOOTHROYD, J. C. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 51, p. 291-300, 1992.

SICK, H. IN: **Ornitologia Brasileira**. 3 Ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira., p. 256, 1997.

SIGRIST, T. IN: **Aves do Brasil: Uma visão artística**. 2 Ed. Avis Brasiliis, p. 416, 2006.

SMITH, D. D. & FRENKEL, J. K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. **Journal of Wild Life Disease**, v. 31, n. 1, p. 15-21, 1995.

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

SOGORB, F. S.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C.. DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Rev. Inst. Med. Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 314-320, 1972.

SOGORB, F. S.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Tropical de São Paulo**, v. 19, p.191-194, 1977

STILES, J. PRADE, R.; GREENE, C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. **American Journal of Veterinary Research**. v. 7, n. 3, p. 264-267, 1996.

STOVER, J. Toxoplasmosis in Captive Ungulates. IN: FOWLER, M. E. (Ed). **Zoo & Wild Animal Medicine**, 3 ed. Denver: W. B. Saunders Company, 1993, p. 511-513.

SULLIVAN, P. S. & PARDO, A. D. Challenging cases internal medicine. What's your diagnosis? **Veterinary Medicine**, v. 88, n.4, p. 309-320, 1993.

SZABO, K. A.; MENSE, M. G.; LIPSCOMB, T. P.; FELIX, K. J.; DUBEY, J. P. Fatal toxoplasmosis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 907-908, 2004.

TENTER, A. M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v. 23, p. 391, 1999.

VICKERS, M. C.; HARTLEY, W. J.; MASON, R. W.; DUBEY, J. P.; SCHOLLAM, L. Blindness associated with toxoplasmosis in canaries. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 1723–1725, 1992.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Cienc. Agr.**, v. 13, n. 1, p. 69-75, 1992.

VITALIANO, S, N.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA.E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 253-260, 2004.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A.; FLECK, D. G.; PERKINS, M.; OLADEHIN, B. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **Journal of Clinical Pathology**. . 29, p. 150-153, 1976.

WILSON, M.; WARE,D. A.; JUNAREK, D. D. Serologic aspects of toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 2, p. 277-286, 1990.

WOLFSON, F. Mammalian *Toxoplasma* in erythrocytes of canaries, ducks, and duck embryos. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 21, p. 653–658, 1941.

WONG, S. Y. & REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, v. 7, p. 299-316, 1993.

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

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

ZAMAN, V. Morphology of *Toxoplasma* oocysts and its comparison with other cat coccidian. South Asian. **J. Trop. Med. Pub. Health**, v. 01, n.03, p.329-335, 1970.

ZARNKE, L.; DUBEY, J. P.; KWOK, O. C.; VER HOEF, J. M. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in selected wildlife species from Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 2, p. 219-224, 2000.