

CLÁUDIO ALESSANDRO MASSAMITSU SAKAMOTO

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE GATAS GESTANTES
COM CISTOS TECIDUAIS DE *Toxoplasma gondii* DE
DIFERENTES GENÓTIPOS**

Araçatuba – SP
SETEMBRO/2007

CLÁUDIO ALESSANDRO MASSAMITSU SAKAMOTO

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES
GENÓTIPOS DE *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX,
1909) EM GATAS GESTANTES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Katia D. Saraiva Bresciani

Araçatuba – SP
SETEMBRO/2007

Dedico este trabalho aos meus pais Cláudio e Leila, e aos meus irmãos Keila e Christian, pelo amor, incentivo e por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Katia Denise Saraiva Bresciani, pela oportunidade da realização deste projeto, pela grande amizade e compreensão sempre sinceras, e pela orientação indispensável durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Alvimar José da Costa, pela orientação desde o meu ingresso no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR), pela compreensão para a realização deste curso de pós-graduação e sugestões no projeto e em todas as situações do lado profissional.

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari e à Dr^a. Hilda Fátima de Jesus Pena pela recepção amigável e atenciosa nos seus laboratórios, pelos ensinamentos e auxílio na realização de parte deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Murilo Abud Bichuette e Cristiane Moro Betini pelo excelente desempenho e disposição para a realização deste projeto científico.

Ao Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante, pela auxílio na análise estatística revisão do artigo orientação desde o meu ingresso no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR), pela compreensão para a realização deste curso de pós-graduação e sugestões no projeto e em todas as situações do lado profissional.

Ao Prof. Dr. Gilson Helio Toniollo e às residentes Tathiana, Michele e Fabiana, do Setor de Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da FCAV/ UNESP/ Jaboticabal, pelo auxílio na realização dos exames ultra-sonográficos.

Ao supervisor Prof. Dr. Luis Fernando de Oliveira e Silva Carvalho e ao técnico Eugênio do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da FCAV/ UNESP/ Jaboticabal, pelo auxílio na realização dos hemogramas.

Às técnicas Francisca de Assis Adison e Maria Inês Yamazaki de Campos do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/ UNESP/ Jaboticabal, pelo auxílio nos procedimentos de necropsia.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Vasconcelos Meirelles e à Prof. Dra. Valeria Marçal Felix de Lima pela atenciosa correção e discussões nesta dissertação.

Aos amigos do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR) Rafael, Luís Fernando, Fernando, Anderson, Carolina, Livia, Tatiana, Thaís, Roberto, Heloísa, Nancy, Vando, Tiago, Daniel, Marina, Fortunato, Anderson Moura entre outros que contribuíram direta e indiretamente neste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	9
3.1.GERAL.....	10
3.2. ESPECÍFICOS.....	10
4. RESULTADOS.....	11
Artigo enviado para publicação.....	12
5. CONCLUSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1. Valores de ocorrência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos no período de 1999 a 2007 em diferentes países.	6
Tabela 1. Caracterização molecular por meio do PCR–RFLP dos dois isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> , provenientes de felinos, utilizados no presente projeto.	14
Tabela 2. Sinais clínicos observados em gatas gestantes infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> do isolado tipo I (grupo 1) ou com tipo III (grupo 2) e em gatas não infectadas (grupo 3).....	17
Tabela 3. Observações obstétricas relacionadas às gatas gestantes inoculadas com o isolado tipo I (grupo 1) ou com tipo III (grupo 2) de <i>Toxoplasma gondii</i> e em gatas do grupo não infectado (grupo 3).....	18
Tabela 4. Recíprocas dos títulos de anticorpos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta em soros de gatas gestantes infectadas com cistos teciduais de <i>Toxoplasma gondii</i> do tipo I (1, 2, 3 e 4) ou tipo III (5, 6, 7 e 8) e controle (9, 10, 11, 12).....	19

SAKAMOTO, C. A. M. **INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE GATAS GESTANTES COM CISTOS TECIDUAIS DE *Toxoplasma gondii* DE DIFERENTES GENÓTIPOS.** Araçatuba, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, do Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba. 2007.

RESUMO

Doze gatas, sorologicamente negativas para *Toxoplasma gondii*, foram distribuídas em três grupos de quatro animais cada. Os animais dos grupos 1 e 2 foram infectados com cistos teciduais de *T. gondii*, por via oral, no terço médio de gestação, sendo: grupo 1 - isolado tipo I altamente virulento para camundongos; grupo 2 - isolado tipo III não virulento para camundongos; e grupo 3 – gatas controle não infectadas. Antes da infecção e durante todo o período experimental foram efetuadas avaliações clínicas. Amostras sanguíneas foram colhidas nos dias 0 (antes da inoculação), 15 e 30 dias pós-infecção para a realização de hemogramas e pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 16). A infecção com o isolado de *T. gondii* virulento (tipo I) ocasionou diarreia, vômito, secreções ocular e vaginal e aborto de uma cria. Nas gatas inoculadas com o isolado tipo III não patogênico, foram observados diarreia, vômito, hiporexia, secreções nasal e ocular purulentas e um parto prematuro com natimortos. Todas as oito gatas infectadas com cistos teciduais de *T. gondii* apresentaram anticorpos contra *T. gondii* pela RIFI. Em dois filhotes da mesma ninhada, pertencentes ao grupo 1, foram detectados títulos de 16 e 64 aos 10 dias de vida. No grupo 2, títulos de 16, 32 e 32 foram detectados em três filhotes da mesma ninhada. Os resultados deste estudo demonstram que cistos teciduais de *T. gondii* de genótipos dos tipos I e III (pelo marcador SAG 2) provocaram transtornos reprodutivos semelhantes em gatas gestantes primoinfectadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, gatas, gestação, infecção congênita, diferentes genótipos.

SAKAMOTO, C. A. M. **EXPERIMENTAL INFECTION OF DIFFERENT GENOTYPES *Toxoplasma gondii* TISSUE CYSTS ON PREGNANT QUEENS.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, do Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba. 2007.

ABSTRACT

Twelve pregnant queens, serologically negative to *Toxoplasma gondii*, were distributed into three groups of four animals each. Animals were infected orally with tissue cysts of *T. gondii*, in the middle third of their pregnancies as follows: group 1 – was infected with isolate type I highly virulent for mice; group 2 – was infected with isolate type III not virulent for mice; group 3 - no infected control queens. Clinical profiles of the animals were determined before infection and during the whole experimental period. Blood samples of the queens were taken in the following days: 0 (before the inoculation), 15 and 30 days post infection for blood count and for the antibodies detection against *T. gondii* by the indirect immunofluorescent antibody test (IFAT ≥ 16). Virulent *T. gondii* (type I) infection caused vomiting, diarrhea, purulent eye secretion, haemorrhagic vaginal secretion and abortion of one pregnancy. Queens infected with non pathogenic type III isolate developed diarrhea, emesis, hyporexia, purulent nose and ocular secretions and one premature stillbirth. In all eight infected queens with tissue cysts *T. gondii* antibody were detectable by IFAT. In two kittens of the same litter, from group 1, had been detected titers of 16 and 64 at 10 days of age. In group 2, titers of 16, 32 and 32 were detected in 3 kittens of the same litter. Infection with tissue cysts of types I and III (SAG 2 marker) of *T. gondii* isolates developed similar clinical and reproductive disturbance in primary infected pregnant queens.

KEY-WORDS: *Toxoplasma gondii*, queens, pregnancy, congenital infection, different genotypes

1. INTRODUÇÃO

Os felídeos podem eliminar nas fezes os oocistos de *Toxoplasma gondii*, formas evolutivas aperfeiçoadas pela seleção natural para suportar as adversidades ambientais, podendo ser altamente infectantes para diversas espécies de mamíferos e aves. Deve-se lembrar que o gato é um dos animais domésticos de mais íntimo convívio com o ser humano. Desse modo, investigações relativas à toxoplasmose nesta espécie são fundamentais, tendo em vista o potencial zoonótico desta enfermidade e sua patogenicidade em animais de produção e de estimação.

Essa protozoonose é particularmente interessante sob o ponto de vista de saúde pública. Além da seriedade da transmissão transplacentária e suas seqüelas para as mulheres gestantes, também há o risco de aquisição desta enfermidade na vida pós-natal. Já foram comprovados distúrbios reprodutivos, como aborto e mortalidade neonatal, em pequenos ruminantes, suínos e cães, enfatizando a relevância do estudo da toxoplasmose congênita e seus reflexos.

A biologia molecular vêm contribuindo de forma relevante com a parasitologia veterinária. Estudos anteriores de genotipagem de *T. gondii* de isolados de gatos do Brasil, efetuados em camundongos, encontraram os tipos I e III, sendo que praticamente todos os isolados do tipo I foram patogênicos e os do tipo III apresentaram uma parte deles virulenta e bastante letal e outra fração não virulenta, com sobrevivência de 100% dos animais infectados

Os resultados obtidos neste estudo representam uma expressiva contribuição científica, considerando-se que ainda não foi executada infecção experimental com cistos dos isolados dos tipos I e III de *T. gondii*, em gatas gestantes, ressaltando-se o ineditismo do assunto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A toxoplasmose é uma zoonose de caráter cosmopolita (TENTER et al., 2000; GIRALDI et al., 2002; DUBEY, 2004). A investigação e o esclarecimento da cadeia epidemiológica da toxoplasmose foram possíveis a partir da elucidação do ciclo biológico deste coccídio apicomplexa (HUTCHISON et al., 1968, 1970, 1971; SHEFFIELD, MELTON, 1970; WITTE, PIEKARSKI, 1970; FRENKEL et al., 1970; FRENKEL, 1973). O felino pode atuar como hospedeiro definitivo (FRENKEL et al., 1970) ou intermediário e abrigar estágios extra-intestinais (DUBEY et al., 1996; URQUHART et al., 1998; DUBEY, 2002).

A ingestão de cistos tissulares, de oocistos provenientes de fezes de felinos infectados e a infecção congênita são as três formas principais de transmissão de *T. gondii*. Outras formas de menor importância incluem a ingestão de leite contaminado, transferência de fluídos orgânicos e transplante de órgãos (DUBEY, 1986; DUBEY et al., 1990; POWELL et al., 2001; MIRÓ et al., 2004).

A microscopia eletrônica tem propiciado detalhes da diferenciação ultra estrutural dos gamontes (SPEER; DUBEY, 2005) e sua patogenia tem sido elucidada por meio da caracterização molecular (GARCIA et al., 2004; SCHWARZ et al., 2005). Estudos recentes confirmaram a hipótese antiga que a transmissão do parasito é mais eficiente quando gatos consomem cistos teciduais, pelo carnivorismo (DUBEY et al., 2006).

O maior risco de aquisição desta enfermidade é na vida pós-natal (ESCUISSATO et al., 2004), fase em que podem ocorrer graves alterações comportamentais, como déficit de atenção e esquizofrenia (LAFFERTY, 2005) reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos (McALLISTER, 2005). Deve-se atentar para os fatores de risco de aquisição da infecção pré-natal bem como considerar sua patogenia e seqüelas (KRAVETZ, FEDERMAN, 2005; BACHMEYER et al., 2006; HUNG et al., 2007).

Essa protozoonose é particularmente interessante sob o ponto de vista de saúde pública. Como exemplo, foi estimada a ocorrência de 1.437.500 casos novos por ano nos Estados Unidos da América (EUA), com um custo aproximado de US\$ 445 milhões por ano, calculando-se gastos com hospitalização, tratamento, escolas e cuidados especiais com crianças mentalmente retardadas (TODD, 1989). Aproximadamente 300 pessoas morrem por ano nos EUA devido à toxoplasmose congênita em neonatos (estimado em um infectado em 1000 nascimentos por ano) e pela doença em pacientes

severamente imunodeprimidos, seja naqueles que recebem terapias imunodepressivas para transplantes de órgãos e tecidos, tratamento para câncer e diálise renal, ou que padecem de enfermidades imunodepressoras, como doenças auto-imunes ou a síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS (SMITH, 1993; JONES et al., 2001).

Por tratar-se de uma infecção oportunista extremamente freqüente nos pacientes com AIDS, sendo a causa mais comum de infecção secundária do sistema nervoso central em pessoas imunocomprometidas, pode propiciar graves encefalites (PASSOS et al., 2000; MAMIDI et al., 2002; COLLAZOS, 2003; YADAV et al., 2004; PRADHAN et al., 2007).

Foram utilizadas formas evolutivas de *T. gondii* em infecções induzidas experimentalmente em várias espécies animais (COSTA et al., 1977; KANETO et al., 1997; WINGSTRAND, et al., 1997; JUNGENSEN et al., 2001; DUBEY, HAMIR, 2002), em fêmeas gestantes (COSTA, 1979; VIDOTTO, COSTA, 1987; MARQUES, 1988; JUNGENSEN et al., 2001; BRESCIANI et al., 1999, 2001), incluindo gatas (DUBEY, HOOVER, 1977; SATO et al., 1993; DUBEY et al., 1995; 1996; POWELL et al., 2001).

Infecções experimentais em gatos freqüentemente são assintomáticas, poucos animais adoecem e raramente ocorrem óbitos (OMATA et al., 1990; SATO et al., 1993). Aborto e mortalidade neonatal foram descritos em gatas gestantes inoculadas com cistos teciduais de *T. gondii*, por via oral (DUBEY, HOOVER, 1977; SATO et al., 1993; DUBEY et al., 1996; POWELL et al., 2001).

Powell et al. (2001) inocularam cinco fêmeas felinas gestantes utilizando três cepas diferentes de *T. gondii* (ME-49, Mozart e Naggie). Os autores encontraram diferenças na virulência dessas cepas em produzir doença ocular sem outro comprometimento orgânico. Entretanto, a genotipagem desses isolados não foi realizada neste trabalho.

Resultados de estudos sobre a freqüência da infecção toxoplásmica em gatos em diferentes regiões do mundo nos últimos cinco anos, encontram-se sintetizados no

Quadro 1. Valores de ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos no período de 1999 a 2007 em diferentes países.

LOCALIDADE	SOROPREVALÊNCIA (%)	MÉTODO*	REFERÊNCIA
Brasil	73,0	RIFI	GARCIA et al. (1999)
Austrália	39,0	ELISA	SUMMER, ACKLAND (1999)
Brasil	46,0	RIFI - IgG	CARVALHO (1999)
	43,4	RIFI - IgM	
Brasil	19,4	RIFI	LANGONI et al. (2001)
Brasil	26,3	MAT	SILVA et al. (2002)
Brasil	84,4	MAT	DUBEY et al. (2004)
Estados Unidos	42,0	MAT	DE FEO et al. (2002)
Estados Unidos	48,0	MAT	DUBEY et al. (2002b)
Bélgica	70,2	Aglutinação Direta	DORNY et al. (2002)
Espanha	45,0	MAT	GAUSS et al. (2003)
Brasil	17,0	Hemoaglutinação indireta	MEIRELLES et al. (2004)
	40,0	ELISA	
Espanha	32,3	RIFI	MIRÓ et al. (2004)
Colômbia	45,2	MAT	DUBEY et al. (2006)
França	18,6	MAT	AFONSO et al. (2006)
Tailândia	11,0	LAT	JITTAPALAPONG et al. (2006)
Brasil	35,4	MAT	PENA et al. (2006)
Brasil	25,0	RIFI	BRESCIANI et al. (2007)

* RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA: Reação de Ensaio Imunoenzimático; MAT: Teste de Aglutinação Modificada; LAT: Teste de Aglutinação em Látex

O estudo da diversidade genética de um parasito pode contribuir para a avaliação de características biológicas como virulência, resistência a drogas, diversidade imunológica, sendo possível correlacionar estas variantes ao rastreamento epidemiológico do agente para a identificação de fontes de infecção ou vias de transmissão. Ao mesmo tempo, podem gerar conhecimentos para a melhoria no diagnóstico, tratamento e controle, além de grande valor informativo ao investigar genótipos provenientes de infecções em animais (TIBAYRENC, 1996; OWEN, TREES, 1999; TENTER et al., 2000).

Estudos moleculares e isoenzimáticos mostram que o *T. gondii* apresenta uma estrutura populacional altamente clonal, embora tenha a oportunidade de recombinação genética em um ciclo sexuado bastante definido nos hospedeiros definitivos. Uma consequência desta clonalidade seria a exibição de características relacionadas à patogenicidade (SIBLEY et al., 1995). O *T. gondii* consistiria, então, de três linhagens clonais predominantes, designadas como tipos I, II e III, ocorrendo de forma global nos

animais e no homem (DARDÉ et al., 1992; HOWE, SIBLEY, 1995). Howe et al. (1997) desenvolveram este sistema de tipificação baseado na técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição sobre produtos Amplificados pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR-RFLP), utilizando como marcador o gene *SAG2*, que codifica o antígeno de superfície *p22*, localizado no cromossomo *VIII* do parasito (SIBLEY et al., 1995).

O camundongo (*Mus musculus*) tem sido utilizado preferencialmente como modelo experimental da toxoplasmose. É sabido que a maioria das amostras virulentas para camundongos pertence ao tipo I, enquanto quase todos os isolados não virulentos são enquadrados nos tipo II ou III (HOWE, SIBLEY, 1995). Porém esta correspondência entre virulência e padrão molecular da amostra não necessariamente deve ser observada em todos os hospedeiros (GRIGG, SUZUKI, 2003). Howe e Sibley (1995) verificaram o predomínio do genótipo tipo II em seres humanos, particularmente associados com a reativação de infecções crônicas em pacientes aidéticos. Estes pesquisadores notaram também que amostras tipo I estavam mais relacionadas com toxoplasmose congênita em pessoas e que o genótipo III foi preponderante em animais.

As cepas isoladas de *T. gondii* de gatos, cães e frangos no Brasil são dos tipos I e III, não sendo ainda identificado o tipo II (DUBEY et al., 2003; DUBEY et al., 2004; SILVA et al., 2005; PENA et al., 2006; DUBEY et al., 2007).

Em um estudo de Dubey et al. (2004), foram isoladas 37 amostras de *T. gondii* de 54 gatos domésticos do Paraná, do município de Santa Izabel do Ivaí, onde surto de toxoplasmose em humanos foi detectado. Estes isolados foram 15 do tipo I e 22 do tipo III. A maioria das cepas isoladas foi virulenta em camundongos, sem diferença em relação à genotipagem.

Pena et al. (2006) isolou 47 amostras de *T. gondii* provenientes de 71 gatos de 13 municípios em diferentes regiões do estado de São Paulo. Foi observado que 34 (72,4%) eram do tipo I, 12 (25,5%) eram do tipo III e 1 (2,1 %) apresentava infecção mista com genótipos I e III. No bioensaio em camundongos, houve diferença estatística significativa em relação à proporção de animais que vieram a óbito nos inoculados com o genótipo tipo I (97%), em relação ao genótipo tipo III (42%).

Outro fato peculiar que se observa com os isolados brasileiros refere-se à alta virulência para camundongos. Em estudos com isolados de outros continentes, raramente são observadas mortes em camundongos infectados com isolados do tipo III (Dubey et al., 2002a, 2003).

Sabendo das diferenças na virulência dos isolados tipos I e III em camundongos e por estes isolados, tanto os do tipo I como os do tipo III, ser letais para camundongos em nosso meio, pesquisas com infecção experimental com diferentes espécies animais com estes diferentes isolados, devem ser desenvolvidas, podendo fornecer informações sobre a patogenia da doença em espécies de maior importância epidemiológica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar a infecção com cistos teciduais de *T. gondii* utilizando os isolados do tipo I (altamente virulento para camundongos) e do tipo III (não virulento para camundongos), genotipados pelo marcador *SAG 2*, no processo reprodutivo de gatas gestantes primoinfectadas.

3.2. Objetivos Específicos:

3.2.1. Comparar a patogenicidade dos dois isolados de *T. gondii* por meio de observações clínicas das gatas prenhas e dos filhotes.

3.2.2. Avaliar a resposta imunológicas através da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* presentes no soro das gatas e dos filhotes pela Reação de Imunofluorescência Indireta.

3.3.3. Avaliar a influência da infecção por isolados dos tipos I e III de *T. gondii* nos parâmetros de hemograma.

4 RESULTADOS

Artigo enviado à revista **Research in Veterinary Science**.

EXPERIMENTAL INFECTION OF DIFFERENT GENOTYPES *Toxoplasma gondii* TISSUE CYSTS ON PREGNANT QUEENS

Claudio A. M. Sakamoto^{1,2}; Katia D. S. Bresciani¹; Alvimar J. da Costa²; Solange M. Gennari³; Hilda F. J. Pena³; Gilson H. Toniollo⁴; Murilo A. Bichuette²; Cristiane M. Betini²; Alessandro F. T. Amarante⁵

ABSTRACT

Twelve pregnant queens, serologically negative to *Toxoplasma gondii*, were distributed into three groups of four animals each. Animals were infected orally with tissue cysts of *T. gondii*, in the middle third of their pregnancies as follows: group 1 – was infected with predominantly type I isolate highly virulent for mice; group 2 - with isolate predominantly type III not virulent for mice; group 3 - no infected control queens. Clinical profiles of the animals were determined before infection and during the whole experimental period. Blood samples were collected on days 0 (before the inoculation), 15 and 30 pos infection for blood count and antibodies detection against *T. gondii* by the indirect immunofluorescent antibody test (IFAT). Infection with virulent isolate of *T. gondii* (Type I) caused vomiting, diarrhea, purulent nose secretion, haemorrhagic vaginal secretion and abortion from one litter. The same clinical signals and premature stillbirth of one litter were observed in queens infected with non pathogenic type III isolate. IFAT showed *T. gondii* antibodies in all eight infected queens. In two kittens of the same litter (group 1), titers of 16 and 64 at 10 days of age had been detected. In the same occasion, in group 2, titers of 16, 32 and 32 were detected in three kittens of the

¹ Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP – Campus de Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP, CEP: 16.050-680. Tel: (+55) 18-36361370. Fax: (55) 16-32021720. E-mail: katia@fmva.unesp.br

² Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – FMVZ - USP.

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal.

⁵ Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu.

same litter. Infection with tissue cysts of types I and III (*SAG 2* marker) of *T. gondii* isolates developed similar reproductive disturbance in primary infected pregnant queens.

KEY-WORDS: *Toxoplasma gondii*, queens, pregnancy, congenital infection, different genotypes

1. INTRODUCTION

Felids may act as intermediate (DUBEY et al., 1996; DUBEY, 2002) or definitive hosts of *Toxoplasma gondii* disseminated in the environment by fecal oocysts (FRENKEL et al., 1970). Abortion and neonatal mortality were described in pregnant queens orally inoculated with tissue cysts from different strains of this protozoa without genotypical characterization (DUBEY; HOOVER, 1977; DUBEY, 1977; SATO et al., 1993; DUBEY et al., 1995; POWELL et al., 2001).

The *SAG2* gene has being widely used as a marker in the genotyping system, based on the Restriction Fragment Length Polymorphism by Polymerase Chain Reaction (PCR-RFLP) technique as described by Sibley et al. (1995) and Howe et al. (1997). By means of that marker, North American and European isolates of *T. gondii* were classified into three predominant clonal strains, designated as types I, II and III and occurring in Man as well as in animals (DARDÉ et al., 1992). Most virulent mice samples belonged to type I while almost all non-virulent isolates were characterized as of types II or III (HOWE; SIBLEY, 1995).

However, it knows that correspondence between the virulence and the molecular pattern of the sample may not be observed in all hosts (GRIGG; SUZUKI, 2003). Based on locus *SAG2*, *T. gondii* genotypes I and III, a varied virulence pattern, were detected in Brazil in dogs (SILVA et al., 2005; DUBEY et al., 2007b), cats (DUBEY et al., 2004; PENA et al., 2006), pigs (SANTOS et al., 2005), free-ranging chickens (DUBEY et al., 2002; 2003a; 2003b; 2007a), sheeps, goats and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) samples.

In order to increase resolution and discrimination between archetypal and atypical lineages, Su et al. (2006) developed other nine PCR-RFLP markers (c22-8,

c29-2, L358, PK1, new SAG2, BTUB, GRA6, SAG3 and Apico), utilizing Brazilian animals isolates. With addition of these markers, it was observed a highly diversified genetic pattern with a clear distinction of *T. gondii* populations in free-ranging chickens (DUBEY et al., 2007a) and dogs (DUBEY et al., 2007b). However, studies evaluating the molecular standard of *T. gondii* isolates and the pathogenicity of this in domestic animals or the man had been not yet carried out.

The important role of felids in the epidemiology of toxoplasmosis, the aim of this paper had to study the patogenicity of different *T. gondii* isolates on the pregnancy of queens.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. *Toxoplasma gondii* isolates

Tissue cysts from two strains of *T. gondii* primarily isolated from naturally infected cats, TgCatBr 71 and TgCatBr 60 (PENA et al., 2006), were employed. These were molecularly characterized by PCR-RFLP using markers SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, CS3, a new SAG2 and APICO. Isolate TgCatBr 71 caused 100% death in primary isolation in mice and it was called here to type I-pathogenic. TgCatBr60 did not show to be lethal to mice, it has been called Type III-non pathogenic (Table 1).

Table 1. PCR–RFLP molecular characterization of two domestic cats *Toxoplasma gondii* isolates, naturally infected in São Paulo State, Brazil, used in this work (Pena et al, 2006).

Strains designation	Origin of isolates	No. of mice died/ no. of mice infected**	PCR-RFLP genotype/ molecular markers											
			SAG1	new SAG2	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3
TgCatBr71	Pirassununga - SP - Brazil	(5/5)	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	I
TgCatBr60	Guafrá - SP - Brazil	(0/3)	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III

T. gondii isolates were kept in cryogenic tubes containing Dimethyl sulfoxide (DMSO) 12.5% and BSA 4% in RPMI-1640 medium at -192°C in liquid nitrogen. The two *T. gondii* samples selected for the experiment were unfreezed then inoculated in mice for reactivation. Initially, cryogenic tubes were removed from liquid nitrogen and immersed on water at 37°C for rapid unfreezing. Content was transferred to a 15mL centrifugation tube with 3mL of bovine fetal serum (BFS) and centrifugated to 15000 RPM for 4 minutes at 4°C. The supernate was removed and the sediment resuspended

on a RPMI-1640 medium with 20% bovine fetal serum (nearly 3mL), homogenized and inoculated subcutaneously in five Swiss mice.

The virulent Type I isolate (TgCatBr71) was submitted to two further successive passages in groups of five mice and one final passage through a group of 20 mice. On the three first passages after unfreezing there was death by toxoplasmosis of all inoculated mice. Death occurred between the 11th and the 16th days after inoculation. The presence of tachyzoites of *T. gondii* was confirmed by *al fresco* microscopic examination of the lungs as previously described (DUBEY; BEATTIE, 1988). Mice of the groups subsequent to unfreezing were inoculated subcutaneously with 1.0-1.2mL of lung macerate in NaCl 0,15M (saline). On the fourth passage after unfreezing mice were treated daily with 150mg of sulfadiazine in 200mL of water *ad libitum* for infection chronification. Medication was suspended one week before queens inoculations.

Six weeks after inoculation, the five mice initially inoculated with (TgCatBr60) non-virulent Type III isolate were serologically examined for anti-*T.gondii* antibody research with a 1:25 dilution using the Modified Agglutination Test (MAT) following the technique described by Dubey e Desmonts (1987). All animals proved seropositives (titer ≥ 25). Two months after inoculation the animals underwent euthanasia and brain fragments were examined *al fresco* with light microscopy for *T. gondii* research; cysts were found on all mice. Brains were then macerated and homogenized in saline and a group of 20 mice were subcutaneously inoculated with 1.0-1.2mL of macerate per animal. Six weeks after inoculation these animals too were examined for anti-*T. gondii* antibody research as previously described. All animals were found serologically positive and they were utilized to infect the queens.

2.2. Experimental queens

Throughout the entire experiment period twelve pregnant queens were kept in individual stainless steel cages receiving water and food *ad libitum*. These cats were observed from four to six months before being infected and only those negative to anti-*T. gondii* antibodies (RIFI ≤ 16) and to anti-*Neospora caninum* (RIFI ≤ 16) took part in the study. Two consecutive exams 30 days apart were carried out to confirm them free from that agent. The queens were observed daily for possible signals of oestrus being thereupon immediately identified. Two male seronegative to *T. gondii* and *N. caninum* cats were used for breeding. In order to confirm pregnancy and inclusion in study, the

queens were monitored from the 20th to the 25th day after breeding using ultrasound scans. Queens inoculated with *T. gondii* were kept apart from non-infected animals (group 3) and all cages, food and water dispensers, sanitary trays and the experimental room were daily hygienized with 100°C water steam.

2.3. Experimental design

This work was submitted to evaluation and approved by Animal Experimentation Ethics Commission (protocol no. 25/05) at UNESP/Araçatuba, São Paulo, Brazil.

The original 12 pregnant queens were distributed into three four-animal groups. Between the 23rd and the 34th pregnancy days (Table 2), after a 24 hour fasting, *T. gondii* tissue cysts were administered orally as follows: Group 1 – Type I isolate highly virulent for mice ; Group 2 – Type III isolate non virulent for mice ; and Group 3 – control, non infected.

All cats were followed throughout their pregnancies until term. All liveborns stayed with their mothers until the 10th day of life when they underwent blood collection.

2.4. Clinical, blood and serum examination of parent and offspring cats

Clinical examinations were carried out daily and transabdominal ultrasound scans every fifteen days or under suspicion of changes or fetal losses.

Blood samples were collected on the 0th (inoculation), 15th and 30th days after infection and blood counts carried out (FELDMAN et al, 2000). At the same periodicity as for blood count serum of all pregnant queens was obtained for IFAT (≥ 16), following Camargo (1964).

Blood samples for anti-*T. gondii* antibody research, IFATRIFI (≥ 16), were collected at the 10th days old from the jugular vein of all liveborns.

2.5. Statistical Analyses

Blood count averages were utilized from variance analysis (One-Way Analysis of Variance) using Minitab (version 11, 1996) and were compared by the Tukey test with a significance level of 5%.

3. RESULTS

3.1. Blood and clinical changes

In the seven days prior to infections, pregnant queens did not show clinical or obstetrician changes observable by habitual semiological examination.

Tables 2 and 3 summarize the main clinical signals observed on each animal and the correspondent day of manifestation. All queens in the control group delivered without incidents and they did not present clinical alterations during this study.

Queen #2 of Group 1 showed emesis associated to diarrhea. Cat # 3 had haemorrhagic vaginal secretion resulting in the abortion of two offsprings which were duly eaten. Diarrhea and purulent eye secretion were observed in cat #4.

In Group 2, cat # 5 had diarrhea and anorexia, #6 showed emesis, nasal secretion and vaginal secretion preceding the premature stillbirth of four offsprings and #7 had purulent eye secretion.

Monocytosis was verified in Group 1 on the 15th DPI. There was a significant difference ($P \leq 0.05$) in the average monocyte count in comparison with the other groups. There was no significant differences in the other blood count parameters.

Table 2. Clinical signals observed in pregnant queens infected with *Toxoplasma gondii* isolates Type I (Group 1) or Type III (Group 2) and in non-infected pregnant queens (Group 3).

Groups	Queens number	<i>T. gondii</i> genotype ¹	Clinical signs*/ (Interval of pos-inoculation days)					
			Vomiting	Diarrhea	Hiporexia	Nasal purulent secretion	Ocular purulent secretion	Haemorrhagic vaginal secretion
1	1	Tipo I	-	-	-	-	-	-
	2		9	(7-9)	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-	(11-15)
	4		-	(5-9)	-	-	(11-14)	-
2	5	Tipo III	-	(7-8)	(7-8)	-	-	-
	6		-	-	-	-	-	-
	7		(15-17)	-	-	(17-19)	-	(21-25)
	8		-	-	-	-	(16-25)	-
3	9	no infected	-	-	-	-	-	-
	10		-	-	-	-	-	-
	11		-	-	-	-	-	-
	12		-	-	-	-	-	-

¹ *T. gondii* strains are genetically recombinants, but they are designed in this study as being of types I and III.

* - = no clinical signals

Tabela 3. Obstetrical observations related to pregnant queens inoculated with *Toxoplasma gondii* isolate Type I (Group 1) or Type III (Group 2) and in queens in the non-infected group (Group 3).

Groups	Queens number	<i>T. gondii</i> genotype *	Inoculation (days of gestation)	Obstetric observations					
				Days of total gestation	Pos-infection days	Number of kittens	Healthy kittens	Abortion	Premature stillbirth
1	1	Type I	30	57	27	6	6	0	0
	2		23	59	28	5	5	0	0
	3		25	40	15	2	0	2	0
	4		34	56	22	4	4	0	0
Total						17	15	2	0
2	5	Type III	31	59	28	2	2	0	0
	6		34	56	22	4	4	0	0
	7		25	50	25	4	0	0	4
	8		33	56	23	5	5	0	0
Total						15	11	0	4
3	9	No infected	-	58	-	3	3	0	0
	10		-	60	-	4	4	0	0
	11		-	59	-	6	6	0	0
	12		-	58	-	2	2	0	0
Total						15	15	0	0

* *T. gondii* strains are genetically recombinants, but they are designed in this study as being of types I and III.

3.2. Serological examination of queens and kittens

Table 4 shows anti-*T. gondii* antibody titer value for cats in groups 1, 2 and 3.

While titers ≥ 16 were not found in animals of the control group, all infected females responded to antigenic stimulation. Three of the four cats inoculated with isolate Type III presented seroconversion on the 15th DPI. However, humoral response could be observed in only one pregnant queen on the same occasion. Maximum titers of 512 e 2048 was observed for Groups 1 and 2, respectively.

In Group 1, two newborns of cat #1 were positive with titers of 16 and 64 at the 10th day of life. In Group 2, three offsprings from cat #6 showed titers of 16, 32 and 32. Offsprings of other infected queens did not present positive serology on that occasion nor did those born from queens in the control group.

Table 4. Reciprocal numbers of titers of antibodies obtained by IFAT of pregnant queens infected with tissue cysts of *Toxoplasma gondii* of Type I (Group 1) or Type III (Group 2) and control (Group 3).

Pos-inoculation days	Queens number/ IFAT titers											
	Group 1				Group 2				Group 3			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	128	-	-	-	128	64	64	-	-	-	-	-
30	64	512	16	16	2048	256	256	64	-	-	-	-

* infection day

4. DISCUSSION

The physiological parameters (temperature, cardiac frequency, respiratory frequency) of all experimental queens remained unchanged with respect to the limits of normality mentioned in Feitosa (2004).

Vomiting, diarrhea and hiporexia were clinical signals noted in both groups (Table 2) in agreement with the works of Dubey (1986), Lappin et al. (1989) e Bresciani (2003). In this study eye and nose secretion, clinical manifestations previously related by Dubey, 1986 and Carvalho, 1999 were observed in cats.

Vaginal sanguinolent secretion four days before abortion or premature delivery were respectively observed in one queen of Group 1 and in one of Group 2. Vaginal secretion can be the only abortion indicator independently of its etiology (MIALOT, 1988).

All cats in the control group had normal deliveries without clinical or blood changes. The 32 breedings of the infected groups yielded two stillborns (Group 1), four deaths a few hours after delivery (Group 2) and 26 apparently normal survivors. Abortion, neonatal mortality and debilitated newborns were mentioned in relation to pregnant queens in which *T. gondii* cysts were orally administered (DUBEY; HOOVER, 1977; DUBEY, 1977; SATO et al., 1993; DUBEY et al., 1995; POWELL et al., 2001). In those studies many strains were used however none of them was genotyped.

The rise in the number of monocytes verified in Group 1 on the 15th day of the experiment may be attributable to inflammation, tissue destruction and neutrophilia (COWELL; DECKER, 2000).

In this study only five out of twenty ten days old offsprings from queens in Groups 1 and 2, showed RIFI antibodies, their titers being equal to or less than those demonstrated by their respective parents on the same date.

Dubey et al. (1995) related in queens experimentally infected with *T. gondii* cysts no materno-fetal transfer of immunoglobulin was observed and they assume that lactational rather than transplacental transmission was considered more common and colostrum-acquired serum antibodies presented reduction from the 15th days old and disappeared by the 10th weeks old of the offsprings.

The queen that suffered abortion (Group 1) and the one that delivered four prematures (Group 2) showed on occasion anti-*T. gondii* antibodies with titers 16 and 256, respectively. Higher titers were observed on the 30th DPI, with values 512 and 2048 for Groups 1 and 2, respectively. In felids experimentally infected with *T. gondii* seroconversion was verified from the 7th (CARVALHO et al., 1999) and 15th DPI. It is interesting to note that there has been no humoral response in three of the four queens of Group 1 examined on the 15th DPI however on the 30th DPI all animals were serologically positive. It is possible that the larger number of cysts inoculated in mice with the less pathogenic and more cystogenic Type III strains may have caused a greater antigenic stimulation in cats in Group 2.

The results of this study demonstrate that these *T. gondii* isolates of Types I and III produced similar reproductive disorders, which indicate no different patogenicity in primary infected pregnant queens.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Research Project of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil. S.M. Gennari, A.J. Costa and A.F.T. Amarante are in receipting of a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

REFERENCES

- BRESCIANI, K.D.S., 2003. Estudo da reinfecção por *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Mancecaux, 1909) em cadelas gestantes naturalmente infectadas. 2003. 132 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- CAMARGO, M.E., 1964. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical. 3, 117-118.
- CARVALHO, C.S., 1999. Padronização do Elisa Teste para a detecção de anticorpos das classes IgM e IgG em soros de gatos experimentalmente infectados com taquizoítos de *T. gondii*. 1999. 76 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.
- COWEL, R. L.; DECKER, L. S., 2000. Interpretation of leukocyte responses. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Shalm's Veterinary Hematology. Lippincott: Williams & Wilkins. 382-390.
- DARDÉ, M.L; BOUTEILLE, B; PESTRE-ALEXANDRE, M., 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. Journal of Parasitology. 78, 786-794.
- DUBEY, J.P., 1977. Attempted transmission of feline coccidian from chronically infected queens to their kittens. Journal of American Veterinary Medical Association. 170, 541-543.
- DUBEY, J.P. 2002. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. Journal of Parasitology. 88, 713-717.
- DUBEY, J. P., 1986. Toxoplasmosis. Journal of American Veterinary Medical Association. 189, 166-170.

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

DUBEY, J.P., DESMONTS, G., 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal*. 19, 337-339.

DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M.C.B.; BANDINI L.M.; YAI, L.E.O.; KWOK, O.C.H.; SU, C., 2007b. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* in São Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology*. 93, 60-64.

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

DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H; SILVA, D.S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., 2003. *Toxoplasma gondii* isolates of free range chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype and oocyst shedding by cats. *Journal of Parasitology*. 89, 851-853.

DUBEY, J.P.; HOOVER, E.A., 1977. Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 170, 538-540.

DUBEY, J.P.; LAPPIN, M.R.; THULLIEZ, M., 1995. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 207, 179-185.

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

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; THULLIEZ,

P.; LEHMANN, T., 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brasil: seroprevalence, tissue distribution, and biological and genetic characterization of isolates. *Journal of Parasitology*. 90, 721-726.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.L.; SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.H.; SUESCUISSATO, C.; AGUIAR, R.O.; GASPARETTO, E. L.; MÜLLER, N.L., 2007a. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Veterinary Parasitology*. 143, 182-188

DUBEY J.P.; SU, C.;CORTE´S, J.A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J.E.; POLO, L.J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L.E.; LORA, F.; JIMENEZ, J.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary Parasitology*. 141, 42–47.

FEITOSA, F. L. F., 2004. *Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico*. São Paulo: Editora Rocca.

FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C., 2000. *Shalm´s Veterinary Hematology*. Lippincott: Williams & Wilkins.

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

GRIGG, M.E.; SUZUKI, Y., 2003. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infectious*. 5, 685-690.

HOWE, D.K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L.D., 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 1411-1414.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L. D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*. 172, 1561-1566.

LAPPIN, M. R.; GREENE, C. E.; PRESTWOOD, A. K.; DAWE, D. L.; TARLETON, R. L., 1989. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. *American Journal of Veterinary Research*. 50, 1580-1585.

MIALOT, J.P., 1988. Patologia da reprodução de carnívoros domésticos. Porto Alegre: Hora Veterinária, 1988. 160 p.

OMATA, Y.; OIKAWA, H.; KANDA, M.; MIKAZUKI, K.; NAKABAYASHI, T.; SUZUKI, N., 1990. Experimental feline toxoplasmosis: humoral immune responses of cats inoculated orally with *Toxoplasma gondii* cysts and oocysts. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 52, 865-867.

PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M., 2006. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo State, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Research in Veterinary Science*. 81, 58-67.

POWELL, C.C.; BREWER, M.; LAPPIN, M.R., 2001. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Veterinary Parasitology*. 102, 29-33.

RAGOSO, A.M.A., 2007. Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos. 2007. 114 F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, C.B.A.; CARVALHO, A.C.F.B.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; YAI, L.E.O.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M., 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 131, 207-211.

SATO, K.; IWAMOTO, I.; YOSHIKE, K, 1993. Experimental toxoplasmosis in pregnant cats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 55, 1005-1009.

SIBLEI, L.D; HOWE, D.K.; WAN, K.L; KHAN, S.; ASLETT, M.A.; AJIOKA, J.W., 1995. *Toxoplasma* as a model genetic system. In: SMITH, D.F.; PARSONS, M. *Molecular biology of parasitic protozoa*. Oxford: Oxford University Press. 55-74.

SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; LIMA, V.Y.; MORETTI, L.A.; PINHEIRO, J.P.; TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G; LANGONI, H., 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Veterinary Parasitology*. 127, 23–27.

YAI, L.E.O., 2007. Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) 2007. 137 F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo.

5. CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos, por meio do delineamento experimental utilizado, extraíram-se as seguintes inferências:

- Os isolados de *T. gondii* TgCatBr 71 (tipo I) e TgCatBr 60 (tipo III) causam sinais clínicos semelhantes na infecção experimental de gatas prenhas.
- Monocitose pode ser verificada em gatas infectadas com *T. gondii* do tipo I.
- A infecção com cistos teciduais com os isolados de *T. gondii* dos tipos I e III produziram transtornos reprodutivos semelhantes em fêmeas gestantes primoinfectadas.
- A detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pode ser constatada a partir de 7 dias pós-infecção com maior res títulos aos 30 dias pós-infecção.
- A detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pode ser verificada aos dez dias de idade em filhotes de mães infectadas no terço médio de gestação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

AFONSO, E.; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT, E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). **Int. J. Parasitol.**, v. 36, n.13, p.1373-1382, 2006.

BACHMEYER, C.; MOUCHNINO, G.; THULLIEZ, P.; BLUM, L. Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. **J. Infect.**, v. 52, n. 2, p. e55 –e57, 2006.

BRESCIANI, K.D.S. **Estudo da reinfecção por *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em cadelas gestantes naturalmente infectadas.** 2003. 132 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.

BRESCIANI, K.D.S.; TONIOLO, G.H.; COSTA, A.J.; SABATINI, G.A.; MORAES, F.R. Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1039-1043, 2001.

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; TONIOLO, G.H.; SABATINI, G.A.; MORAES, F.R.; PAULILLO, A.C.; FERRAUDO, A.S. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. **Vet. Parasitol.**, v. 86, n. 2, p. 143-145, 1999.

BRESCIANI, K. D. S.; GENNARI, S. M.; SERRANO, A. C. M.; RODRIGUES, A. A. R.; UENO, T.; FRANCO, L. G.; PERRI, S. H. V.; AMARANTE, A. F. T. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitol. Res.**, v.100, n.2, p. 281-285, 2007.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 3, n. 6, p. 117-118, 1964.

CARVALHO, C.S. **Padronização do Elisa Teste para a detecção de anticorpos das classes IgM e IgG em soros de gatos experimentalmente infectados com taquizoítos de *T. gondii*.** 1999. 76f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista. 1999.

COSTA, A. J. **Toxoplasmose congênita natural em bovinos e infecção experimental de vacas gestantes com oocistos de *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1908) NICOLLE e MANCEAUX, 1909.** 1979. 88 f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

COSTA, A.J.; ARAÚJO, F.G.; COSTA, J.O.; LIMA, J.D.; NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, v. 63, n. 2, p. 212-218, 1977.

COLLAZOS, J. Opportunistic infectious of the CNS in patients with AIDS: diagnosis and management. **CNS Drugs**, v. 17, n. 12, p. 869-887, 2003.

COWEL, R. L.; DECKER, L. S. Interpretation of leukocyte responses. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Lippincott: Williams & Wilkins. 2000, p. 382-390.

DARDÉ, M.L; BOUTEILLE, B; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. **J. Parasitol**, v. 78, n. 5, p. 786-794, 1992.

DE FEO, M.L.; DUBEY, J.P.; MATHER, T.N.; RHODES, R.C. Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. **Am. J. Vet. Res.** v. 63, n. 12, p. 1714-1717, 2002.

DORNY, P.; SPEYBROECK, N.; VERSTRAETE, S.; BAEKE, M.; BECKER, A.D.E.; BERKVENS, D.; VERCRUYSSSE, J. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. **Vet. Rec.**, v. 151., n. 21, p. 626-629, 2002.

DUBEY, J.P. Attempted transmission of feline coccidian from chronically infected queens to their kittens. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 5, p. 541-543, 1977.

DUBEY, J.P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **J. Parasitol**, v. 88, n. 4, p. 713-717, 2002.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** , v. 189, n. 2, p. 166-170, 1986.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: a waterborn zoonosis. **Vet. Parasitol.**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J.P.; DESMONTS, G. Sorological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Vet. J.**, v. 19, p. 337-339, 1987.

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

DUBEY, J.P.; HOOVER, E.A. Attempted Transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 170, n. 5, p. 538-540, 1977.

DUBEY, J.P.; GREENE, C.E.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia. W. B. Saunders, 1990, p. 818-834.

DUBEY, J.P.; LAPPIN, M.R.; THULLIEZ, M. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 207, n. 2, p. 179-185, 1995.

DUBEY, J. P.; MATTIX, M. E.; LIPSCOMB, T.P. Lesions of neonatally induced toxoplasmosis in cats. **Vet. Pathol.**, v. 33, n. 3, p. 290-295, 1996.

DUBEY, J.P.; SAVILLE, W.J.A.; STANEK, J.F.; REED, S.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. **J. Parasitol.**, v. 88, n. 4, p. 802-803, 2002b.

DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H.; SILVA, D.S.; LEHMANN, T.;BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. *Toxoplasma gondii* isolates of free range chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocist shedding by cats. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 851-853, 2002a.

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 of free range chickens from Paraná. Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 117, n. 3, p. 229-234, 2003.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brasil: seroprevalence, tissue distribution, and biological and genetic characterization of isolates. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.L.; SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.H.; SUESCUISSATO, C.; AGUIAR, R.O.; GASPARETTO, E. L.; MÜLLER, N.L. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Vet. Parasitol.**, v.143, n.2, p.182-188, 2007.

DUBEY J.P.; SU, C.;CORTE´S, J.A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J.E.; POLO, L.J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L.E.; LORA, F.; JIMENEZ, J.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Vet. Parasitol.**, v. 141, p. 42-47, 2006.

ESCUISSATO, D.; DE AGUIAR, RODRIGO O.; GASPARETTO, E.; MULLER, N. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: high-resolution CT appearance. **J Thorac. Imaging**, v. 19, n. 3, p. 207-209, 2004.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária**: a arte do diagnóstico. São Paulo: Editora Rocca, 2004.

FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. **The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma** and related genera. Baltimore. University Park Press. pp. 343-410, 1973.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v.167, n. 919, p.893-896, 1970.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, p. 99-104, 1999.

GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; NAVARRO, I.T.; MACHADO, R.Z.; SINHORINI, I.L. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. **Experim. Parasitol.**, v.108, n. 1/2, p.40-46, 2004.

GAUSS C.B.L.; ALMERÍA S.; ORTUÑO A.; GARCIA F.; DUBEY J.P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. **J. Parasitol.**, v. 89, n. 5, p. 1067-1068, 2003.

GIRALDI, N.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L.; OGAWA, L.; KOBYLKA, E. Toxoplasma antibody and stool parasites in public school children, Rolândia, Paraná, Brazil. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, v.35, n.3, p. 215-219, 2002.

GRIGG, M.E.; SUZUKI, Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 7, p. 685-690, 2003.

HOWE, D.K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect Dis**, n. 6, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HUNG, C.C.; FAN, C.K.; SU, K.E.; SUNG, F.C.; CHIOU, H.Y.; GIL, V.; FERREIRA, M.D.A. C.; CARVALHO, J.M.; CRUZ, C.; LIN, Y.K.; TSENG, L. F.; SAO, K.Y.; CHANG, W. C.; LAN; H.S.; CHOU, S.H. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe.. **Trans. Royal Soc.Trop. Med.**, v. 101, n.2, p. 134-139, 2007.

HUTCHISON, W.M.; DUNACHIE, J.F.; WORK, K. The fecal transmission of *Toxoplasma gondii*. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 74, n. 3, p.462-464, 1968.

HUTCHISON, W.M.; DUNACHIE, J.F.; SIIM, J.C.; WORK, K. Coccidian - like nature of *Toxoplasma gondii*. **Br. Med. J.**, v.1, n. 5689, p.142-144, 1970.

HUTCHISON, W.M.; DUNACHIE, J.F.; WORK, K.; SIIM, J.C. The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. **Transp. R. Soc.Trop. Med. Hyg.**, v.65, n.3, p.380-399, 1971.

JITTAPALAPONG, S; NIMSUPAN, B.; PINYOPANUWAT, N.; CHIMNOI, W.; KABEYA, H.; MARUYAMA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. **Vet.Parasitol.**, v. 45, n. 1-2, pp. 138-141, 2006.

JONES, J.L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 56, n. 5, p. 296–305, 2001.

JUNGENSEN, G.; BILE-HANSEN, V.; JENSEN, L.; LIND, P. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. **J. Parasitol.**, v. 87, n.1, p. 108-13, 2001.

KANETO, C.N.; COSTA, A.J.; PAULILLO, A.C.; MORAES, F.R.; MURAKAMI, T.O. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. **Vet. Parasitol.**, v. 69, n. 3-4, p. 203-210, 1997.

KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The Am. J. Med.**, v. 118, n. 3, p. 212-216, 2005.

LAFFERTY, K.D. Look what the cat dragged in: do parasites contribute to human cultural diversity?. **Behav. Processes**, v. 68, n. 3, p. 279-282, 2005.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; CUNHA, E.L.P.; CUTOLO, A.A. Prevalence of toxoplasmosis in cats from Sao Paulo and Parana States. **Braz. J. Vet. Res. An. Science**. v. 38, n. 1/6, p. 243-244, 2001.

LAPPIN, M. R.; GREENE, C. E.; PRESTWOOD, A. K; DAWE, D. L.; TARLETON, R. L. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. American **Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 9, p. 1580-1585, 1989.

MAMID, A.; SIMONE, J. A.; POMERANTZ, R. J. Central nervous system infectious in individuals with HIV-1 infectious. **J. Neurovirol.**, v. 8, n. 3, p. 158-167, 2002.

MARQUES, L.C. **Infecção experimental de éguas gestantes com oocistos de *Toxoplasma gondii*. NICOLLE e MANCEAUX, 1909 (APICOMPLEXA : SARCOCYSTIDAE).** 1988. 104 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

McALLISTER, M. M. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” toxoplasmosis. **Vet. Parasitol.**, v.132, n. 3/4, p.241-247, 2005.

MEIRELES, L.R.; GALISTEO JUNIOR, A.J.; POMPEU, E.; ANDRADE JUNIOR, H.F. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Trop. Med. Int. Health**, v. 9, n. 8, p. 876-881, 2004.

MIALOT, J.P. **Patologia da reprodução de carnívoros domésticos**. Porto Alegre: Hora Veterinária, 1988. 160 p.

MIRÓ, M.; MONTROYA, A.; JIMÉNEZ, S.; FRISUELOS, C.; MATEO, M.; FUENTES, I. Prevalence of antibodies to *toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. N. **Vet. Parasitol.**, v. 126, n., p. 249-255, 2004.

OMATA, Y.; OIKAWA, H.; KANDA, M.; MIKAZUKI, K.; NAKABAYASHI, T.; SUZUKI, N. Experimental feline toxoplasmosis: humoral immune responses of cats inoculated orally with *Toxoplasma gondii* cysts and oocysts. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v. 52, n. 4, p. 865-867, 1990.

OWEN, M.R.; TREES, A.J. Genotyping *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **J. Parasitol.**, v. 85, n. 21, p. 382-384, 1999.

PASSOS, L.N.; ARAÚJO FILHO, O.F.; ANDRADE JUNIOR, H.F. Toxoplasmosis encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 42, n. 3, p. 141-5, 2000.

PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; DUBEY, J.P; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 58-67. 2006.

POWELL, C.C.; BREWER, M.; LAPPIN, M.R. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. **Vet. Parasitol.**, v.102, n.1, p.29-33, 2001.

PRADHAN, S.; YADAV, R.; MISHRA, V. N. *Toxoplasma* meningoencephalitis in HIV-seronegative patients: clinical patterns, imaging features and treatment outcome. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, n. 1, p. 25-33, 2007.

RAGOSO, A.M.A. Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos. 2007. 114 F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SANTOS, C.B.A.; CARVALHO, A.C.F.B.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; YAI, L.E.O.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.131, n. 3-4, p. 207-211, 2005.

SATO, K.; IWAMOTO, I.; YOSHIKE, K. Experimental toxoplasmosis in pregnant cats. **J. Vet. Med. Sci.** v. 55, n. 6, p. 1005-1009, 1993.

SCHWARZ, J.A.; FOUTS, A.; CUMMINGS, C.A.; FERGUSON, J.P.; BOOTHROYD, J. A novel rhoptry in *Toxoplasma gondii* bradyzoites and merozoites. **Molec. Biochem. Parasitol.**, v. 144, n. 2, p. 159-166, 2005.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells, **Science**. v. 167, n. 919, p. 892-3, 1970.

SIBLEI, L.D; HOWE, D.K.; WAN, K.L; KHAN, S.; ASLETT, M.A.; AJIOKA, J.W.; *Toxoplasma* as a model genetic system. In: SMITH, D.F.; PARSONS, M. **Molecular biology of parasitic protozoa**. Oxford: Oxford University Press, 1995. p.55-74.

SILVA, A.V., PEZERICO, S.B.; LIMA, V.Y.; MORETTI, L.A.; PINHEIRO, J.P.; TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. **Vet. Parasitol.**, v. 127, n. 1, p. 23–27, 2005.

SILVA, J. C. R.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; AMAJONES, V. R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L. E. O.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, **Brazil. J. Parasitol.**, v. 88, n. 2, p. 419-20, 2002.

SMITH, J.L. Documented outbreaks of toxoplasmosis: transmission of *Toxoplasma gondii* to humans. **J. Food Prot.**, v. 56, n.7, p. 630-9, 1993.

SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 2, p.193-206, 2005.

SUMMER, B.; ACHLAND, M.L. *Toxoplasma gondii* antibody in domestic cats in Melbourne. **Aust. Vet. J.**, v. 77, n. 7, p. 447 – 449, 1999.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TIBAYRENC, M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, n. 50, p. 401-429, 1996.

TOOD, E. C. D. Preliminary estimates of costs in foodborne disease in the United States. **J. Food Prot.**, v.52, p. 595-601, 1989.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A .M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273 p.

VIDOTTO, O.; COSTA, A.J. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I. Observações clínicas e hematológicas. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec.**, v.39, p.623-39, 1987.

YADAV, V.; CHU, NG K; RAIS, R.H.; AL SAFARJALANI, O.N.; GUARCELLO, V.; NAGUIB, F.N.M.; EL KOUNI, M.H. Synthesis, biological activity and molecular modeling of 6-benzylthioinosine analogues as subversive substrates of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase. **J. Med. Chemistry**. v. 47, n. 8, p. 1987-1996, 2004.

WINGSTRAND, A.; LIND, P.; HAUGEGAARD, J.; HENRIKSEN, S.; BILLE-HANSEN, V.; SORENSEN, V. Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Vet. Parasitol.**, v.72, n.2, p.129-40, 1997.

WITTE, H. M.; PIEKARSKI, G. Die Oocysten-Ausscheidung bei experimentell infizierten Katzen in Abhängigkeit vom Toxoplasma-Stamm, **Z. Parasitenkd.**, v. 33, n.4, p. 358-60, 1970.

YAI, L.E.O. Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) 2007. 137 F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.