



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL



Toxoplasmose congênita em ovelhas reinfectedadas experimentalmente

Thaís Rabelo dos Santos

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL



Toxoplasmose congênita em ovelhas reinfectedadas experimentalmente

Thaís Rabelo dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Co-Orientador: Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

Trabalho realizado no “CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal” e no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

THAÍS RABELO DOS SANTOS - filha de Geraldo Izidório dos Santos e Amélia Rabelo dos Santos, nascida em 23 de maio de 1981, Santos – SP. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba, em dezembro de 2004. Iniciou em janeiro de 2005 a atividade de pesquisadora no CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal, pertencente à FCAV/UNESP e foi selecionada para o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pelo Departamento de Patologia Animal desta mesma instituição, obtendo o título de Mestre em 2008, ano em que ingressou no curso de Doutorado nesta mesma Faculdade.

DEDICO

*A minha filha, **Júlia**, por todo amor, ternura e inocência.*

*Aos meus pais, **Geraldo e Amélia**, por me darem forças para chegar até aqui e sobretudo, por todo apoio, amor, carinho, dedicação incansável e muita paciência.*

*Ao **João Luiz Doni**, por todo apoio e carinho durante todos esses anos.*

*Ao meu irmão **Rodrigo** e minha cunhada **Jussânia** pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado.*

*Ao **Prof. Alvimar José da Costa**, que sempre me amparou e me deu forças para que esta tese se tornasse realidade.*

É para vocês em especial que dedico este trabalho!

AGRADEÇO

À Deus.

Ao **Prof. Alvimar José da Costa** pela orientação e por todos estes longos anos de apoio, atenção, orientação, confiança, conselhos, compreensão e ensinamentos para minha vida e formação profissional. Muito obrigada.

Ao **Prof. Gilson Pereira de Oliveira** pela dedicação e atenção dispensada na execução deste trabalho e acima de tudo, pelos ensinamentos transmitidos nestes anos de convivência.

Ao **CPPAR – Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – FCAV/UNESP**, por ter me proporcionado conhecimentos necessários à minha formação profissional e sustentação no decorrer do curso de Pós-graduação (Doutorado).

À **Profa. Kátia Denise Saraiva Bresciani**, pelo apoio e pelas inúmeras sugestões dadas para que pudesse concretizar este trabalho.

Ao meu amigo **Welber Daniel Zanetti Lopes**, pelas incontáveis contribuições dadas para que este trabalho pudesse ser realizado.

As bolsistas **Gabriela da Silva Magalhães Faria** (FAPESP), **Bruna Martins Guerreiro** (FAPESP), **Nathália Helena Pereira da Silva Dal Pietro** (CNPq). Indispensáveis na condução deste trabalho. Obrigada, todo este resultado é nosso.

A todos os **pesquisadores** (Breno, Carlos Augusto, Carol, Cláudio, Gabriel, Ives Charlie, Helenara, Luís Fernando, Marquinhos, Rafinha, Welber, Weslen e Willian), **estagiários** (André) e **funcionários** (Ana, Bigode, Cacilda, Cidinha, Daniele, Fortunato,

Gisele, José Lúcio, Lilian, Luizinho, Priscila e Matilde) do CPPAR, que de forma direta ou indireta contribuíram para este trabalho e na minha formação profissional.

À **Ana Lúcia Doni** e ao **Fortunato Alexandre Ferreira**, com os quais aprendi muito e que também contribuíram para a realização e finalização deste trabalho

Ao **Prof. João Luís Garcia** pelas cepas de *Toxoplasma* utilizadas nesta tese e pela transmissão de seus conhecimentos e preciosas sugestões.

Ao **Prof. Dr. Vando Edésio Soares** pela realização das análises estatísticas.

À **Profa. Maria Cecília Rui Luvizotto**, pela amizade, carinho, compreensão, confiança, incentivo, “puxões de orelha”, ensinamentos e orientação na minha Iniciação Científica, que contribuíram muito para minha formação acadêmica. Além das suas valiosas sugestões neste projeto e na minha vida.

As **funcionárias do Centro de Convivência Infantil (CCI)** da FCAV/UNESP, em especial à **Ângela, Letícia e Silvar**, pelos cuidados e amor dedicados a minha filha.

À **Profa. Rosângela Zacarias Machado**, pelo apoio e pelas inúmeras sugestões dadas para que pudesse concretizar este trabalho.

À **Profa. Solange Maria Gennari**, pelo apoio e pelas inúmeras sugestões dadas para que pudesse concretizar este trabalho.

Ao **Dilssélio e Aurélio** de Formiga/MG, que realizaram no campo, tantos projetos de pesquisa, cujos resultados estão publicados em diversos periódicos.

A **Profa. Eunice**, pela amizade, confiança, incentivo e ensinamentos no decorrer da minha vida.

Aos **funcionários do Programa de Pós-graduação** da FCAV/UNESP, pela ajuda e paciência.

A **todos os Professores do Programa de Pós-graduação** da FCAV/UNESP, pela transmissão de seus conhecimentos.

As **Bancas de Qualificação** (Profa. Kátia, Profa. Rose, Prof. Gilson Toniollo e Prof. Paulo) e **Defesa** (Profa. Cecília, Prof. João Luís, Prof. Kaneto e Prof. Paulo) pelas suas enormes contribuições para a finalização deste trabalho.

A **CAPES e FAPESP** pelo apoio financeiro na execução desta tese.

Enfim, a todos que me ajudaram, pois se aqui estou é porque muitos estavam comigo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Histórico.....	1
1.2 Ciclo de vida e morfologia do parasito.....	2
1.3 Importância e transmissão para o homem.....	6
1.4 Toxoplasmose em ovinos.....	9
1.5 Diagnóstico.....	12
1.6 Cepas de <i>T. gondii</i>	14
1.7 Justificativa.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Local do experimento.....	20
3.2 Ovinos experimentais.....	20
3.2.1. Seleção das ovelhas reprodutoras.....	20
3.2.1.1. Exames físicos.....	20
3.2.1.2. Exames ultrassonográficos.....	20
3.2.1.3. Hemogramas.....	21
3.2.1.4. Exames coproparasitológicos.....	21
3.2.1.5. Exames sorológicos.....	21
3.2.2. Seleção dos ovinos reprodutores.....	21
3.2.3. Exames sorológicos realizados para seleção dos ovinos (fêmeas e machos)..	21
3.2.3.1. Brucelose.....	21
3.2.3.2. Leptospirose.....	22
3.2.3.3. Neosporose.....	22
3.2.3.4. Toxoplasmose.....	22
3.3 Cepas de <i>T. gondii</i>	23
3.3.1. Cepa ME49 (primoinfecção).....	23
3.3.2. Cepa VEG (reinfecção).....	23
3.3.3. Cepa RH (antígenos para RIFI).....	23
3.4 Aclimatização e alimentação dos animais.....	23
3.5 Delineamento experimental.....	23
3.6 Primoinfecção por <i>T. gondii</i>	23

3.7 Reinfecção por <i>T. gondii</i>	25
3.8 Programa de sincronização de estro utilizado nas ovelhas reprodutoras.....	25
3.9 Monta natural (machos reprodutores).....	26
3.10 Exames clínicos e laboratoriais.....	27
3.10.1. Parâmetros clínicos.....	27
3.10.2. Exames ultrassonográficos.....	27
3.10.3. Resposta Imune-humoral.....	27
3.10.3.1. Obtenção de antígenos de <i>T. gondii</i> para confecção das lâminas.....	28
3.10.4. Pesquisa de <i>T. gondii</i> em amostras teciduais.....	29
3.10.4.1. Bioensaio em camundongos.....	29
3.10.4.2. Histopatologia.....	30
3.10.4.3. Detecção do DNA de <i>T. gondii</i> pela PCR.....	30
3.10.4.3.1. Extração do DNA das amostras.....	30
3.10.4.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
3.10.4.3.3. Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados pela técnica da PCR.....	31
3.11 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Seleção dos ovinos.....	31
4.2 Obtenção de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	32
4.3 Primoinfecção e reinfecção por <i>T. gondii</i>	32
4.4 Exames clínicos.....	33
4.5 Exames ultrassonográficos.....	43
4.6 Resposta imune-humoral.....	44
4.6.1. Ovelhas.....	44
4.6.2. Cordeiros, natimortos e/ou fetos.....	46
4.6.3. Carneiros.....	47
4.7 Ocorrências clínicas.....	47
4.8 Pesquisa de <i>T. gondii</i> nos tecidos das ovelhas e em seus respectivos cordeiros pelo bioensaio em camundongos.....	52
4.9 Detecção do DNA de <i>T. gondii</i> pela PCR.....	55
4.10 Achados histopatológicos.....	58
5 DISCUSSÃO.....	65

6 CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS.....	76

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µm: micrômetro
SNC: Sistema Nervoso Central
RIFI: Reação de Imunofluorescência indireta
IHA: Hemoaglutinação indireta
FC: Fixação do complemento
ELISA: Ensaio imunoenzimático indireto
MAT: Teste de aglutinação modificado
PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase
°C: Graus Celsius
%: Porcentagem
<: Menor que
>: Maior que
MAD: Método de Aglutinação Direta
RH: Cepa de *Toxoplasma gondii*
rpm: Rotações por minutos
BSA: Soro albumina bovina
µL: microlitros
PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato
pH: Potencial hidrogeniônico
M: Molar
Ig: imunoglobulina
HIV: Vírus da Imunodeficiência Adquirida
AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo do <i>Toxoplasma gondii</i> , com suas várias formas de infecção para o homem (CDC, 2011).....	2
Figura 2. Esquema do delineamento experimental utilizado no estudo (CPPAR/FCAV/ UNESP).....	23
Figura 3. Esquema do protocolo hormonal utilizado na sincronização de estro de ovelhas Santa Inês (CPPAR/FCAV/UNESP).....	25
Figura 4. Carneiro e ovelhas marcadas com tinta vermelha.....	25
Figura 5. “Box plot” das frequências cardíacas mensuradas nas ovelhas primoinfectadas (cepa ME49) e reinfectedadas com $2,5 \times 10^3$ oocistos da cepa VEG de <i>Toxoplasma gondii</i> , pertencentes aos GI, GII e GIII; ovelhas apenas primoinfectadas (cepa ME49) – GIV; e ovelhas pertencentes ao grupo controle negativo (não infectado) – GV.....	34
Figura 6. Frequências cardíacas mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	35
Figura 7. “Box plot” das frequências respiratórias mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	37
Figura 8. Frequências respiratórias mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	38
Figura 9 “Box plot” das temperaturas retais mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	40
Figura 10. Temperaturas retais mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	41

- Figura 11.** Cistos de *T. gondii* identificados no cérebro de camundongos inoculados com macerado de placenta, ovário, útero e “pool” de tecidos obtidos das ovelhas e de seus respectivos cordeiros, natimortos e/ou fetos, pertencentes aos grupos I, II, III e IV. Obj. 20x..... **53**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência (%) de anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos de diferentes regiões brasileiras, técnicas utilizadas e respectivos autores em diferentes estudos.....	10
Tabela 2. Frequências cardíacas mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	33
Tabela 3. Frequências respiratórias mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	36
Tabela 4. Temperaturas retais mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	39
Tabela 5. Título de anticorpos (IgG) obtidos pela reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em ovelhas primoinfectadas, reinfectedadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.....	44
Tabela 6. Título de anticorpos (IgG) obtidos pela reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em cordeiros, natimortos e/ou fetos, provenientes de ovelhas primoinfectadas (cepa ME49) e reinfectedadas com $2,5 \times 10^3$ oocistos (cepa VEG) de <i>Toxoplasma gondii</i> e ovelhas apenas primoinfectadas (cepa ME49).....	45
Tabela 7. Resultados obtidos pela bioprova em camundongos inoculados com fragmentos teciduais obtidos das ovelhas e de seus respectivos cordeiros, natimortos e/ou fetos, pertencentes aos grupos I, II, III, IV e V.....	52
Tabela 8. Resultados obtidos pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), em fragmentos tissulares colhidos de ovelhas	55

primoinfectadas (cepaME49) e reinfectadas com $2,5 \times 10^3$ oocistos (Cepa VEG) de *Toxoplasma gondii* e de seus respectivos cordeiros.....

Tabela 9. Resultados obtidos pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), em fragmentos tissulares colhidos de ovelhas apenas primoinfectadas (cepa ME49) e de ovelhas pertencentes ao grupo controle negativo (não infectado) e de seus respectivos cordeiros.....	56
--	-----------

Toxoplasmose congênita ovelhas reinfectedadas experimentalmente

RESUMO

O elevado índice de ovinos naturalmente infectados por *Toxoplasma gondii*, a grande possibilidade destes animais se reinfectarem com este protozoário e a inexistência de dados sobre a transmissão congênita em uma reinfecção, motivaram a realização deste projeto de pesquisa. O objetivo deste experimento foi estudar a transmissão congênita em ovelhas, infectadas e reinfectedadas experimentalmente com oocistos de *T. gondii*, em três fases gestacionais. Vinte ovelhas em idade reprodutiva, sorologicamente negativas para *T. gondii* (RIFI-IgG), foram selecionadas e primoinfectadas experimentalmente com a cepa ME49 (Dia zero). Três carneiros, sorologicamente negativos para toxoplasmose, neosporose, leptospirose e brucelose, foram utilizados para monta natural (RIFI \leq 512). Posteriormente ao diagnóstico de gestação, estas ovelhas foram distribuídas em quatro grupos experimentais: GI - cinco ovelhas reinfectedadas com *T. gondii* no 40º dia de gestação (DG), GII - cinco no 80º DG, GIII - cinco no 120º DG e GIV - cinco receberam solução salina no 120º DG (controle não reinfectedado). Cinco fêmeas sorologicamente negativas (RIFI $<$ 64) para infecção toxoplásmica foram mantidas como controle negativo (não infectado) - GV. Sete dias antes da primoinfecção, imediatamente antes da inoculação, a cada três dias até o 30º dias pós-inoculação e a cada sete dias até o término da gestação, exames clínicos e pesquisa de anticorpos (RIFI-IgG) contra *T. gondii* foram realizados nas 25 ovelhas. Exames ultrassonográficos foram efetuados para diagnóstico de gestação, posteriormente à reinoculação, a periodicidade deste exame foi quinzenal. Amostras de sangue (soro), de todos os cordeiros provenientes das ovelhas experimentais foram obtidas, imediatamente após o nascimento, no 3º e 14º dia de idade, para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* (RIFI). Parasitismo por *T. gondii* foi pesquisado (histopatologia, bioprova e PCR) em fragmentos tissulares das fêmeas e em fetos abortados, natimortos e/ou cordeiros mortos após o nascimento. Todas as 20 ovelhas primoinfectadas com *T. gondii* apresentaram anticorpos específicos a partir do 11º dia pós-infecção (DPI). O título sorológico máximo diagnosticado, em média, no 28º dia após a reinfecção, foi de 2048. Todas as ovelhas produziram cordeiros sorologicamente positivos para *T. gondii*. Nos grupos I, II, III e IV foram diagnosticadas desordens reprodutivas, tais como malformações fetais, natimortos e cordeiros debilitados. Alguns cordeiros que vieram a termo apresentaram severas

alterações locomotoras. Os resultados do bioensaio em camundongos e da PCR revelaram a presença do *T. gondii*, em todas as 20 ovelhas pertencentes aos grupos I, II, III e IV e seus respectivos cordeiros. Portanto, comprovou-se a transmissão congênita do *Toxoplasma gondii*, associada a desordens reprodutivas, em ovelhas apenas primoinfectadas e, também, nas ovelhas primoinfectadas e, posteriormente, reinfectadas por este protozoário.

Palavras-chaves: Toxoplasmose congênita, ovelhas, reinfecção experimental.

Congenital toxoplasmosis in experimentally reinfected ewes

SUMMARY

The high occurrence of naturally infected sheep with *Toxoplasma gondii*, the great possibility of reinfection and the lack of data on congenital transmission in a reinfection were the motivation of this research project. The aim this study was evaluate the congenital transmission in experimentally reinfected and infected ewes, by oocysts *T. gondii*, in three pregnancies phases. Twenty ewes, negative serologically for *T. gondii* (indirect fluorescent antibody test-IgG), were selected and experimentally infected with ME49 strain (Day0). Three ram, negative serologically for toxoplasmosis, neosporosis, leptospirosis and brucellosis were used for natural mating (IFAT \leq 512). After the diagnosis of pregnancy, these ewes were distributed in four experimental groups: GI - five ewes reinfected with *T. gondii* on the 40th day of gestation (DG), GII - five in the 80th DG, GIII - DG 120th in five and GIV - five received saline solution in 120th DG (unreinfecte). Five ewes, negative serologically (IFA <64) for *T. gondii* infection were kept as negative control (uninfected) - GV. Seven days before the first infection, immediately prior to inoculation, every three days until the 30th day after inoculation and every seven days until the end of pregnancy, clinical examinations and blood samples (IFAT-IgG against *T. gondii*) were performed in 25 ewes. Ultrasonographic examinations were performed in the diagnosis of pregnancy and fortnightly after reinfection. Serum samples, from all the lambs were obtained immediately after birth (pre-colostral), at 3 and 14 days of life, for *T. gondii* (IFAT-IgG). Parasitism by *T. gondii* was investigated (histopathology, mouse inoculation and PCR) in tissue fragments of female and fetuses, stillbirths and/or dead lambs after birth. Twenty ewes showed *T. gondii* antibodies specific on post-inoculation day (PID) 11. The most serological title (2048) occurred 28 days after reinfection. All ewes produced lambs positive serologically for *T. gondii*. In groups I, II, III and IV were diagnosed reproductive disorders, such as birth defects, stillbirths and weak lambs. Some lambs that came forward had severe locomotive disorders. The results of the bioassay in mice and PCR revealed the presence of *T. gondii* in all 20 sheep and their lambs. Therefore, showed the congenital transmission of *Toxoplasma gondii* associated with reproductive disorders in sheep only infected and in ewes infected and subsequently reinfected by this protozoan.

Keywords: Congenital toxoplasmosis, ewes, experimental reinfection.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Histórico

Toxoplasma gondii é um parasito do filo Apicomplexa, ordem Coccidia, sendo um protozoário intracelular obrigatório (PEREIRA-BUENO et al, 2004; RORMAN et al., 2006), que acomete humanos e diversos hospedeiros vertebrados (DUBEY E BEATTIE, 1988; MIRÓ et al., 2004; GARCIA et al., 2006).

Este coccídeo foi descrito pela primeira vez em coelhos de laboratório por SPLENDORE (1908) em São Paulo, Brasil e simultaneamente, por NICOLLE e MANCEAUX (1908) na Tunísia, Norte da África, ao ser encontrado no cérebro de um roedor selvagem, o *Ctenodactylus gundi*.

O gênero foi denominado *Toxoplasma* (do grego toxon = arco, plasma = forma) referindo-se a sua forma de “quarto crescente” ou “meia lua”, e *gondii* em referência ao roedor de onde se isolou o parasito (BLACK e BOOTHROYS, 2000). Em retrospecto, o nome correto para o parasito deveria ter sido *Toxoplasma gundii*, entretanto NICOLLE E MANCEAUX (1908) tinham identificado incorretamente o hospedeiro como *Ctenodactylus gundi* (DUBEY, 2007).

Os primeiros relatos da doença em seres humanos foram realizados nas décadas de 1920 e 1930. Em 1923, JANKÜ observou o agente no olho de uma criança de 11 meses, em Praga, na Tchecoslováquia. TORRES em 1927, no Rio de Janeiro, descreveu o *T. gondii* como causa de meningoencefalite congênita, miocardite e miosite de um recém-nascido com 29 dias de vida. Em ambos os trabalhos foram descritos como *Encephalitozoon*, um protozoário de difícil distinção do *T. gondii* sem colorações especiais. Em 1937, WOLF e COWAN, relataram a doença em várias crianças e demonstraram a transmissão transplacentária, além de isolarem o parasita por inoculação em animal e, na década de 40, PINKERTON e WEINMAN (1940) e PINKERTON e HENDERSON (1941) relatavam a toxoplasmose aguda em adultos (AMATO NETO et al., 1995).

1.2 Ciclo de vida e morfologia do parasito

Os felídeos, em particular os gatos domésticos, constituem os hospedeiros definitivos do parasito (DUBEY E BEATTIE, 1988; LAPPIN, 1993; ASLANTAS et al., 2005; HUTCHISON, 1965; FARIA et al., 2007), enquanto que animais de sangue quente são os hospedeiros intermediários (Figura 1) (DUBEY, 2004; GAUSS et al., 2005; JITTAPALAPONG et al., 2005; GARCIA et al., 2006; SILVA, et al., 2007).

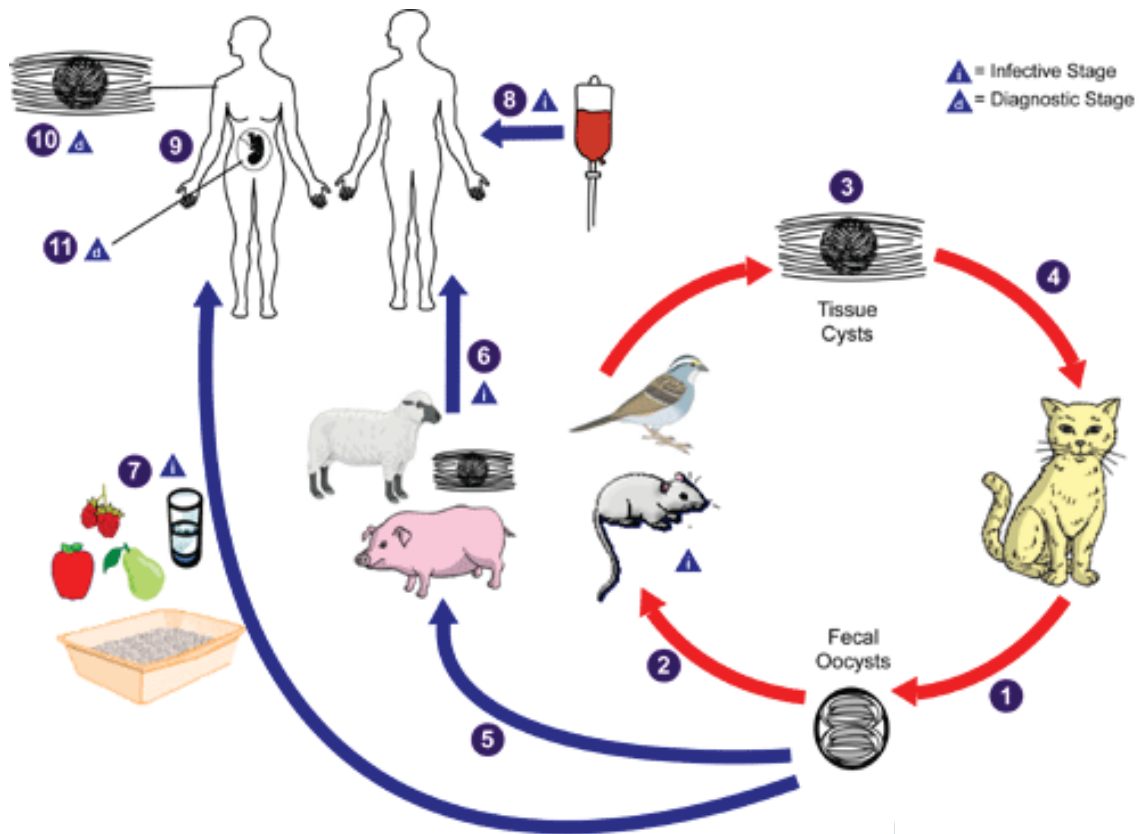


Figura 1. Ciclo do *Toxoplasma gondii*, com suas várias formas de infecção para o homem (CDC, 2011).

No seu ciclo evolutivo, *T. gondii* apresenta três formas infectantes: os esporozoítos (oocistos), taquizoítos (individualmente ou em grupos) e bradizoítos (cistos teciduais) (MILLER et al., 1972). Os taquizoítos, formas de multiplicação rápida, difundem-se no organismo dos hospedeiros intermediários pelo sangue e pela linfa, multiplicando-se assexuadamente no interior das células, por repetidas endodiogenias (DUBEY et al., 1998).

Os oocistos, produto final da reprodução sexuada e que ocorre somente no trato digestivo dos felídeos, seus hospedeiros definitivos, desenvolvem-se na presença de oxigênio e em temperaturas mais baixas que a corpórea, permanecendo viáveis, dependendo das condições ambientais, por até cinco anos na presença de umidade e sendo muito resistente a maioria dos desinfetantes (VIDOTTO et al., 1986). Eles são a chave para a manutenção da infecção, pois o carnivorismo e a transmissão congênita não completam o ciclo de vida deste coccídio nos hospedeiros intermediários (NETO et al., 1995).

Os felídeos podem ser infectados pela ingestão de qualquer uma das três formas evolutivas, ou seja, os taquizoítos, cistos ou oocistos, particularmente a ingestão de cistos teciduais, pelo carnivorismo, a via mais frequente (SWANGO et al., 1989), que induz a um menor período pré-patente, além de uma maior produção e eliminação de oocistos nas fezes, quando comparada a outras formas de infecção.

Após a ingestão de cistos teciduais pelos gatos, caracterizando o ciclo entero-epitelial (WONG e REMINGTON, 1993), a parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado e os bradizoítos são liberados. Alguns penetram na lâmina própria do intestino e multiplicam-se em taquizoítos, que em poucas horas podem ser encontrados em diversos tecidos. Outros bradizoítos penetram nas células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento em numerosas gerações assexuadas (esquizontes tipos A-E) (DUBEY e FRENKEL, 1972).

A reprodução sexuada ocorre quando os organismos (merozoítos) liberados dos esquizontes formam gametas masculinos e femininos. Após a fertilização do gameta feminino, inicia-se a formação da parede do oocisto, que ao atingir a maturidade promove a ruptura da célula do epitélio intestinal liberando então os oocistos para o lúmen (DUBEY, 2004).

Um único gato pode liberar 20 milhões de oocistos por dia em aproximadamente 20 gramas de fezes (FAYER, 1981) e, após decomposição das fezes, a contaminação do solo pode ser de 100.000 oocistos/grama (FRENKEL et al., 1995), por um período de sete a 21 dias. Os oocistos são liberados nas fezes na forma não esporulada, portanto não infectante (FRENKEL et al., 1970; FIALHO e ARAUJO, 2003). A esporulação ocorre no meio ambiente e varia de um a cinco dias, dependendo da temperatura e quantidade de oxigênio. Morfologicamente, os oocistos possuem uma parede dupla bastante resistente às condições ambientais (DUBEY et al., 1970; TENTER et al., 2000) medindo, aproximadamente, 10x13 μm e possuem em seu interior dois esporocistos, medindo cada um 2x8 μm . Cada esporocisto possui quatro esporozoítos de 2x8 μm (DUBEY et al., 1998).

Todos os gatos domésticos são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, embora animais mais jovens, com até um ano de idade, primoinfectados, eliminem um número maior de oocistos nas fezes após terem ingerido cistos teciduais contendo o agente. Gatos adultos, primoinfectados, também eliminam oocistos, porém em menor quantidade e por um período mais curto (LINDSAY et al., 1997).

Embora a maioria dos gatos que já tiveram contato com *T. gondii* desenvolva imunidade e não volte a eliminar oocistos, DUBEY & FRENKEL (1974) comprovaram que gatos soropositivos, frente a quadros de imunossupressão, podem retomar a eliminação dos mesmos. Posteriormente, DUBEY (1995) reinfectou gatos soropositivos, seis anos após terem soroconvertido, e 55% destes reeliminaram oocistos nas fezes, porém, em quantidades bem inferiores à da primoinfecção.

O fato dos felídeos serem os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, foi reforçado por TENTER et al. (2000) que relataram uma evidência epidemiológica em ilhotas e atóis que nunca foram habitados por gatos, inexistem virtualmente as infecções por esse agente .

Os taquizoítos, medem aproximadamente 4 x 9 μm de comprimento por 2 x 4 μm de diâmetro, possuem diversas estruturas comuns às células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, além de estruturas características do filo, como os anéis polares, conóide, roptrias e micronemas. Essas formas de multiplicação rápida difundem-se no organismo dos hospedeiros

intermediários pelo sangue e pela linfa, multiplicando-se assexuadamente no interior das células por repetidas endodiogenias (DUBEY et al., 1998).

O agente utiliza-se de estruturas de superfície e do complexo apical para penetrar na célula hospedeira. Ao aderir à célula, por meio de receptores de superfície (SAG-1), o protozoário orienta seu complexo apical de forma a criar uma junção intracelular, formando um vacúolo (HUYNH et al., 2003). Esse modo de invasão usa um mínimo de exposição de antígenos, o que dificulta o reconhecimento pelo sistema imune (HIRAMOTO et al., 2001). Dessa forma o parasito replica-se rapidamente e se dissemina para vários tecidos como o sistema nervoso central (SNC), olhos, placenta, músculo esquelético e cardíaco, por meio da corrente circulatória (MONTROYA e LIENSENFELD, 2004).

Alguns taquizoítos, após a invasão da célula hospedeira, desenvolvem-se mais lentamente formando os bradizoítos, que irão dar origem aos cistos. Os bradizoítos são morfologicamente semelhantes aos taquizoítos, porém se multiplicam lentamente, expressam moléculas estágio-específicas e são funcionalmente diferentes (MONTROYA e LIENSENFELD, 2004), já os cistos teciduais contêm centenas ou milhares de bradizoítos (DUBEY et al., 1998).

Os cistos, medindo aproximadamente 10 a 100 μm de diâmetro, podem se desenvolver em vários órgãos como, pulmão, fígado, rins, no entanto são mais prevalentes na musculatura (esquelética e cardíaca) e tecido nervoso, incluindo cérebro e olhos. Os cistos intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por longos períodos ou por toda a vida do hospedeiro sem causar nenhuma resposta inflamatória ou despertar resposta tecidual significativa (DUBEY, 2004). O destino dos cistos teciduais ainda não é totalmente conhecido, mas é proposto que possam se romper durante a vida, liberando os bradizoítos que podem ser destruídos pelo sistema imune ou formar novos cistos (DUBEY, 1993).

1.3 Importância e transmissão para o homem

A toxoplasmose afeta, aproximadamente, dois milhões de pessoas em todo mundo (LINDSTON et al., 2006). A importância da toxoplasmose animal decorre, em primeiro lugar, pelo fato de os animais infectados servirem de fonte direta ou indireta de infecção ao homem e, em segundo, pelas diversas alterações reprodutivas como o aborto, a mortalidade neonatal e os defeitos congênitos consequentes à infecção por *T. gondii*, que representam significativos prejuízos em animais de interesse econômico (SAWADOGO et al., 2005; YU et al., 2007) e de companhia (BRESCIANI et al., 1999).

Em animais destinados ao consumo humano 9,6% dos suínos (SUARÉZ-ARANDA et al., 2000), 19,25% dos bovinos e 24,5% dos ovinos (HASHEMI-FESHARKI, 1996), apresentaram positividade para o *T. gondii*, o que demonstra a importância do consumo de carne como uma das fontes de contaminação humana, caso não haja cocção adequada do alimento (DUBEY, 1996). Na Europa, mais de 50% da carne de ovinos e suínos, pesquisada por ACHA & SZYFRES (1986) apresentaram-se parasitadas pelo *T. gondii*

A toxoplasmose é uma das zoonoses de maior disseminação em todo mundo CLEMENTINO et al., (2007), porém a frequência da infecção começou a ser caracterizada a partir de 1948, com SABIN e FELDMAN, e a seguir com outros pesquisadores, ao desenvolverem as primeiras provas diagnósticas da enfermidade.

Dubey (1986) estabelece a transmissão, desta enfermidade, basicamente por três vias: fecal-oral, carnivorismo e congênita.

Em relação à via fecal-oral, os felídeos excretam, por um período de quatro a 14 dias, juntamente com as fezes, oocistos não esporulados de *T. gondii* e, portanto, não infectantes. A esporulação pode levar de um a cinco dias, dependendo das condições ambientais, após a defecação, quando esses oocistos tornam-se infectantes para outras espécies (DUBEY, 1994a).

No carnivorismo, a infecção ocorre pela ingestão de cistos contendo bradizoítos e/ou taquizoítos, presentes na carne de um hospedeiro intermediário (DUBEY, 1996). Quanto à resistência dos cistos na carne, acredita-se que os mesmos não resistam aos processos de salga e aquecimento (acima de 55° C por mais de dois minutos),

utilizados na confecção de carnes industrializadas (DUBEY, 1994b). Entretanto, outros estudos ressaltam que o processo de cura, carnes embutidas (principalmente na forma de salsichas e salames) ou resfriadas, podem representar uma importante via de transmissão da toxoplasmose e podem também ser responsáveis pela alta prevalência de lesões oculares por toxoplasmose no Sul do Brasil (GLASNER et al., 1992; ARIAS et al., 1996).

A infecção pela carne pode acontecer não somente pelo consumo, como também pela manipulação da mesma crua durante o preparo do alimento, contato com superfícies de preparação de alimentos, facas e outros utensílios (SMITH et al., 1992). Estudos recentes realizados por LIU et al., (2009) evidenciaram que o ato das mulheres grávidas experimentarem o tempero das carnes cruas enquanto preparam os alimentos, é um dos principais fatores de risco para que estas mulheres adquiriram a toxoplasmose durante a gravidez.

Existe também a possibilidade de disseminação da doença nos zoológicos com o uso diário de equipamentos, concomitantemente, no recinto dos felídeos, tais como botas, luvas, pás, vassouras e mangueiras (DUBEY, 1986).

Outra via de transmissão reconhecida é contato com cães, devido ao comportamento de alguns deles de ingerir e rolar sobre fezes de gatos, talvez atraídos pelo cheiro. Este comportamento foi denominado de xenosmofilia e possibilitaria a transmissão pelo contato com oocistos esporulados presentes na pelagem de cães que vivem em áreas muito contaminadas (FRENKEL, & PARKER, 1996).

O contato direto com felinos apresenta pouca consequência epidemiológica, entretanto a presença de animais infectados pode indicar um ambiente contaminado, trazendo risco para a população humana e outros animais (SANTOS et al., 2009).

Menos frequente, porém possível, a infecção pode se dar por meio de ingestão de leite não pasteurizado com taquizoítos, já descrita em caprinos por CHIARI et al. (1984), acidentes laboratoriais (WONG & REMINGTON, 1993), transfusão sanguínea (FIGUEROA-DAMIAN, 1998) e transplante de órgãos (MUNIR et al., 2000). Em mulheres, embora não se tenha comprovado a transmissão através da amamentação, BONAMETTI et al. (1997) descreveram um caso positivo de toxoplasmose em uma criança, cuja dieta era constituída exclusivamente por leite materno, e a mãe fazia parte

de um grupo de 17 indivíduos que havia adquirido toxoplasmose pela ingestão de carne ovina crua. Neste caso, um inquérito sorológico na propriedade de origem dos ovinos revelou 43% dos animais soropositivos para toxoplasmose.

O risco de aquisição desta enfermidade na vida pós-natal, também foi demonstrado por DUBEY et al. (1998), GIRALDI et al. (2001), SILVA et al. (2001), KRAVETZ FEDERMAN, 2005; BACHMEYER et al., 2006 e HUNG et al., 2007.

Em humanos, a infecção é muito comum, porém a enfermidade clínica é pouco freqüente. Estima-se que um terço, ou mais, da população possua anticorpos contra o parasita. Somente nos EUA é provável que ocorram 1.437.500 novos casos de infecção por *T. gondii* (TODD, 1989). Ainda nos EUA, segundo SAAD et al. (1996), aproximadamente 300 pessoas morrem anualmente devido à toxoplasmose, tanto na sua forma congênita (neonatos) quanto em indivíduos com severa imunossupressão iatrogênica (transplantados, tratamento de neoplasias, pacientes submetidos à diálise renal) ou que sofram de enfermidades imunossupressoras como doenças auto-imunes ou a síndrome de imunodeficiência adquirida – SIDA (SMITH, 1993).

Em pacientes portadores do vírus HIV, a toxoplasmose manifesta-se com uma elevada freqüência, sendo considerada uma doença oportunista (LUTF & REMINGTON, 1988) que provoca a reativação dos cistos, principalmente os cerebrais, produzindo grave encefalite (PASSOS et al., 2000; HALONEN et al., 2001 e KHETSURIANI et al., 2002; MAMIDI et al., 2002; COLLAZOS, 2003; YADAV et al., 2004; PRADHAN et al., 2007). POTASMAN et al. (1987) observaram uma freqüência de encefalite por *T. gondii* entre seis e 10% de pacientes aidéticos nos EUA. No Brasil, em pacientes acima de 12 anos de idade, a toxoplasmose é a terceira doença associada de maior prevalência, com 11.809 (3,72%) dos 314.582 casos notificados entre 1980 e 1996 (BRASIL, 1996).

1.4 Toxoplasmose em ovinos

A toxoplasmose ovina foi descrita pela primeira vez por OLAFSON & MONLUX (1942), nos Estados Unidos. Estes autores relataram esta enfermidade em uma fêmea que apresentava sintomatologia nervosa, hipertermia, rigidez muscular, entre outros sinais clínicos. O diagnóstico foi estabelecido após necropsia e exame histopatológico do cérebro e medula espinhal do animal.

Em pequenos ruminantes, a toxoplasmose é relativamente comum (MAINAR et al., 1996), sendo responsável por problemas reprodutivos gerando grandes perdas econômicas em rebanhos de ovinos (WYSS et al., 2000; PEREIRA-BUENO et al., 2004), onde a infecção torna-se a principal causa de abortamentos, malformações fetais, nascimento de animais prematuros e mortes neonatais (MALIK et al., 1990), sendo a principal via de infecção a ingestão de oocistos esporulados do parasito (DUBEY & BEVERLEY, 1988).

Infecções adquiridas no início da gestação (antes dos 50 dias), antes do feto desenvolver a capacidade de produzir anticorpos, normalmente ocasionam morte embrionária e reabsorção (HARTLEY, 1961). Se a ovelha infectar-se com *T. gondii* no meio da gestação (70-90 dias) haverá uma considerável probabilidade de aborto ou de natimortos (BEVERLEY e WATSON, 1971; WATSON e BEVERLEY, 1971; MILLER et al., 1982), enquanto que no final da gestação (>110 dias) as ovelhas irão parir normalmente, embora seus cordeiros podem estar infectados congenitamente (WATSON AND BEVERLEY, 1971; BLEWETT et al., 1982; MILLER et al., 1982). Entretanto, poucas pesquisas têm descrito a ocorrência de cordeiros neonatos saudáveis, porém infectados pelo *T. gondii* em populações de ovelhas (DUNCANSON et al., 2001).

Em consequência disto, na Nova Zelândia e em alguns países europeus, tem sido licenciado o uso de uma vacina (cepa atenuada "S48") de taquizoítos, com o objetivo de minimizar as perdas econômicas nestes sistemas de produção (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

No Brasil, as taxas de infecção (Tabela 1) apontadas para rebanhos ovinos variam ou oscilam de 8% (NISHIKAWA et al., 1984) a 55% (LANGONI et al., 1999).

Esta flutuação na ocorrência deve-se principalmente ao tipo de teste sorológico utilizado, à região e a idade dos animais estudados (DUBEY, 1990). A elevada ocorrência de toxoplasmose em ovinos pode estar ligada a menor resistência desta espécie ao parasita e as próprias condições de exploração da ovinocultura que propiciam maior risco de exposição e contato destes animais com os oocistos eliminados pelos gatos (DUBEY & HAMIR, 2002).

Tabela 1. Ocorrência (%) de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos de diferentes regiões brasileiras, técnicas utilizadas e respectivos autores em diferentes estudos.

Região	Estado	Autor	Técnicas	Número de animais examinados	Ocorrência (%)
Norte	Rondônia	CAVALCANTE et al. (2004)	RIFI	141	46,80
Nordeste	Bahia	GONDIM et al. (1999)	RIFI	240	18,75
	Pernambuco	SILVA et al. (2003)	RIFI	173	35,30
Sul	Rio Grande do Sul	AMARAL et al. (1978)	SF	100	23,00
		LARSSON et al. (1980)	SF	100	39,00
		SILVA E COSTA (1981)	RIFI	310	12,00
		NISHIKAWA et al. (1984)	LAT	655	8,00
	Paraná	SILVA E DE LA RUE (2006)	RIFI	87	44,80
Sudeste	São Paulo	ROMANELLI et al. (2007)	RIFI	305	51,47
		LANGONI et al. (1999)	RIFI	352	55,00
		SILVA et al. (2002)	RIFI	100	23,00
		MEIRELLES (2003)	RIFI	200	31,00
		FIGIOULO et al. (2004)	RIFI	597	34,70
Centro Oeste	Distrito Federal	LOPES et al. (2010)	RIFI	488	52,05
		UENO et al. (2009)	RIFI	1028	38,20

RIFI: Reação de Imunofluorescência indireta; SF: Reação de Sabin & Feldman; LAT: Teste aglutinação em látex.

SPOSITO-FILHA et al. (1992) isolaram 20 cepas de *Toxoplasma* do músculo diafragma de 136 ovinos. DA SILVA & LANGONI (2001) identificaram este protozoário no cérebro e diafragma de 34 dos 40 ovinos sorologicamente reagentes à reação de imunofluorescência indireta. Estes trabalhos de isolamento de parasitos viáveis em

tecidos comestíveis, bem como no leite caprino (CHIARI & NEVES, 1984) revelam a importância destas espécies como fonte de infecção para o homem.

O rebanho ovino brasileiro é estimado em, aproximadamente, 17 milhões de cabeças, sendo 782 mil animais mantidos na região Sudeste e destes, 59,76% localizados no estado de São Paulo, que é considerado o maior criador da espécie na região. Nos últimos cinco anos a ovinocultura paulista apresentou um crescimento de 26,18% (IBGE, 2010).

Na região Sudeste do Brasil tem-se tornado usual a utilização de matrizes comuns, sem raça definida, ou ainda de animais deslanados, notadamente da raça Santa Inês. Ovelhas Santa Inês podem ser mantidas em pastagens, sendo menos exigentes em alimentação e consideradas mais prolíferas. Essas fêmeas podem ser cruzadas com reprodutores de raças de corte, Suffolk, Ile de France e Poll Dorset, que conferem ganho de peso elevado às crias mestiças, além de melhorar as características de carcaça, para produção de cordeiros com abate precoce.

Ovelhas da raça Santa Inês mostram-se mais resistentes à infecção natural por tricostrongilídeos que as da raça Suffolk em uma criação de ovinos no Paraná (MORAES et al., 2000). Resultados similares foram observados em Nova Odessa – SP, onde ovelhas Santa Inês apresentaram resistência superior à de ovelhas Suffolk, Ile de France e Poll Dorset (BUENO et al., 2002). Estudos realizados na UNESP, em Botucatu, demonstraram maior resistência de cordeiros Santa Inês às infecções por nematódeos gastrintestinais quando comparados a cordeiros Suffolk e Ile de France (AMARANTE et al., 2004). Da mesma forma, no período do parto, ovelhas Santa Inês apresentaram maior resistência que ovelhas Ile de France (ROCHA et al., 2004).

1.5 Diagnóstico

A confirmação do diagnóstico depende do isolamento do parasito e de sorodiagnóstico positivo (PAIXÃO e SANTOS, 2004).

O diagnóstico sorológico pode ser realizado pela demonstração de título ascendente de anticorpos anti-*T. gondii* em soros pareados ou pela demonstração de elevado título sérico de anticorpos numa única amostra de soro, mas a não

comprovação de título ascendente ou elevado não exclui o diagnóstico de toxoplasmose (LAPPIN, 2004).

Há vários testes sorológicos válidos, sendo os mais comuns, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), hemoaglutinação indireta (IHA), Fixação de Complemento (FC), teste Sabin-Feldmann (dye test) e ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) (SIKES, 1982).

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é de grande importância, uma vez que a infecção tanto no homem como nos animais domésticos e silvestres pode assumir quadros clínicos facilmente confundidos com doenças como, viroses, leptospirose, brucelose, clamidiose e neosporose, dificultando a tomada de medidas específicas de tratamento e controle (VIDOTTO, 1992, DA SILVA et al., 2002).

SABIN E FELDMAN (1948) desenvolveram o teste do corante conhecido também como Dye Test. A seguir, FULTON E TURK (1959), foram os primeiros a desenvolver um teste de aglutinação, que revelou baixa especificidade, e a necessidade de grande número de taquizoítos em cada teste. Posteriormente, DESMONTS E REMINGTON (1980), melhoraram a reprodutibilidade e a sensibilidade do método.

Existe uma grande variação na prevalência da infecção toxoplásmica nas diferentes regiões do mundo, em decorrência das diferentes técnicas empregadas, fato que torna os resultados não passíveis de comparação (CHHABRA et al., 1985).

A Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) é a prova mais utilizada para o diagnóstico da toxoplasmose, sendo utilizada como padrão ouro. Por essa, títulos de 16 ou maiores eram considerados positivos para *T. gondii* (DUBEY e BEATTIE, 1988). Atualmente consideram-se positivos títulos superiores ou iguais a 64 (COSTA et al., 1977; SOUZA, 2001). UCHÔA et al. (1999) detectaram sensibilidade de 83,87% e especificidade de 79,16% para a RIFI- IgG.

Na fase aguda da toxoplasmose, primeiro ocorre a produção de imunoglobulina M (IgM), seguida da produção de imunoglobulina G (IgG). A infecção pode também produzir imunoglobulina A (IgA), no caso da transmissão ter sido por via oral. Pela técnica de imunofluorescência, os anticorpos IgM podem ser dosados 1 a 2 semanas depois do início da infecção, alcançando um pico em 6 a 8 semanas, quando então

declinam. Títulos baixos podem persistir por mais de 12 meses. O anticorpo IgG persiste por toda a vida na maioria dos pacientes (GOLDSMITH, 1998).

De acordo com SANTOS et al., 2010, a RIFI mostrou ser mais eficiente que a imunohistoquímica para a detecção de resultados positivos e negativos de toxoplasmose. Estes autores sugerem que o uso de RIFI em bioensaios em camundongos pode ser recomendada, sem a necessidade de avaliação de cistos cerebrais, o que é extremamente difícil e trabalhoso.

LANGONI et al. (1999), pesquisaram anticorpos anti-*T. gondii* em 352 amostras de soros de ovinos de 18 propriedades do estado de São Paulo, pelas técnicas de RIFI e hemoaglutinação indireta. A RIFI revelou 55,1% de positividade, enquanto que a hemoaglutinação indireta somente 30,4%. Estes dados corroboram para a necessidade de padronização das técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico desta infecção.

O método de aglutinação direta (MAD) tem sido utilizado para evidenciar aglutininas anti-*T. gondii* em diversas espécies de animais domésticos e silvestres (DA SILVA et al., 2002). Trata-se de um teste simples, não necessita de reagente espécie-específicos ou de aparelhagem sofisticada, como o microscópio de imunofluorescência, podendo ser utilizado em amostras de soros humanos como de diferentes espécies animais.

CAPORALI et al. (2005), pesquisaram pela RIFI e MAD a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em soro de suínos provenientes da região de Botucatu e do Estado de Pernambuco, sendo testados pela RIFI 757 soros, dos quais 2,11% (16) foram positivos; no MAD foram analisados 759 soros, com 1,32% (n=10) de soropositivos.

MINHO et al. (2004) avaliando a RIFI e o MAD para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, no soro de 46 suínos experimentalmente infectados, obtiveram uma sensibilidade de 95,7% e especificidade de 97,8% em ambos os métodos.

1.6 Cepas de *T. gondii*

Diferentes cepas de *T. gondii* têm sido isoladas, sendo estas geralmente classificadas como virulentas ou avirulentas, com base na sua patogenicidade e/ou antigenicidade para o modelo experimental camundongo, que por sua vez será resistente ou susceptível (BOHNE et al.1993).

HOWE AND SIBLEY (1995) determinaram a estrutura genética populacional do *T. gondii* e demonstraram a existência de três tipos clonais predominantes: tipos I, II e III.

Cepas do tipo I estão relacionadas à toxoplasmose humana congênita e a virulência aguda em camundongos. Cepas do tipo II relacionam-se aos casos de reativação da infecção crônica em humanos e as cepas do tipo III estão associadas às infecções animais.

As cepas tipo I de *T. gondii* são extremamente virulentas, produzindo altos níveis de parasitemia, aumentando, conseqüentemente, o risco de transmissão transplacentária e a gravidade da infecção em fetos. As cepas tipo II e III proporcionam o desenvolvimento de uma infecção crônica e produzem cistos teciduais em camundongos.

Outro fator que altera a virulência do parasito seria a sua passagem contínua numa mesma espécie animal (JACOBS, 1964). A cepa RH é muito utilizada como padrão na comparação entre cepas. Ela foi isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica (HOWE & SIBLEY 1995). A cepa RH, quando injetada numa dose de 10^5 taquizoítos, em camundongos alogênicos (SWISS) ou isogênicos (BALB/c), leva-os a morte em 6 a 7 dias, sendo por isso considerada uma cepa virulenta.

A cepa ME-49 foi originalmente isolada da musculatura de carneiro. É uma cepa cystogênica e considerada avirulenta ou de baixa virulência (LUNDE & JACOBS 1983). Em camundongos BALB/c a cepa ME-49 de *T.gondii* produz cistos que são evidentes no cérebro. O aparecimento de cistos caracteriza a fase crônica da infecção que persiste por toda a vida destes camundongos.

De acordo com LEHMANN et al. (2000) variantes podem estar melhor adaptadas a diferentes hospedeiros intermediários. É importante a análise de maior número de amostras, originárias de múltiplas fontes de infecção, para avaliação de possíveis associações entre genótipos e a doença nos humanos e animais (OWEN e TREES, 1999).

OWEN E TREES (1999) determinaram que os tecidos naturalmente infectados pelo parasito, em 13 fetos ovinos, dois roedores selvagens e dois camundongos inoculados com material de cordeiros infectados, pertenciam ao genótipo II, indicando que os ovinos podem ser fontes potenciais de infecção para estes indivíduos.

De acordo com a pesquisa de SILVA et al. (2011) pela primeira vez no Brasil, confirmou-se a existência de cepa clonal II. Além disso, uma elevada diversidade do parasita em pequenos ruminantes também foi demonstrada. Esses autores, também, concluem que cordeiros podem ser uma importante fonte de transmissão do *T. gondii* no Brasil.

1.7 Justificativa

A elevada ocorrência da infecção por *T. gondii* em ovinos (Tabela 1), a grande possibilidade destes animais se reinfectarem com este protozoário e a inexistência de informações na literatura sobre a transmissão congênita e as conseqüências patológicas de uma reinfecção, no processo reprodutivo das ovelhas, motivaram a realização deste projeto de pesquisa.

Os trabalhos de infecção experimental (controlados e em condições que mais se assemelham as naturais) são os mais indicados para fornecerem dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos sobre as enfermidades, principalmente em relação à profilaxia. Por esta razão, foram utilizados oocistos, forma evolutiva de *T. gondii* mais disseminada na natureza, na infecção e reinfecção de ovelhas gestantes.

Em humanos a infecção toxoplásmica gera forte imunidade à reinfecção, limitando uma futura transmissão congênita durante as próximas gestações, sendo que qualquer criança subseqüentemente gerada não será infectada (FRENKEL, 1990). Estudos experimentais vacinais usando a cepa atenuada "S48" de *T. gondii* foram bem

sucedidos em limitar a severidade de doenças congênitas, quando ovelhas foram desafiadas com oocistos (BUXTON e INNES, 1995). Entretanto, apesar do sucesso da vacinação em limitar doença congênita e aborto, isso não necessariamente bloqueia a transmissão da enfermidade (BUXTON e INNES, 1995). Também se evidenciou que uma dose oral de oocistos infectantes inoculados antes da gestação foi suficiente para produzir uma resposta imunológica e conseqüentemente neutralizar o desafio parasitário (McCOLGAN et al, 1988).

A hipótese que a primoinfecção protege contra a reinfecção é a base para muitos fazendeiros não descartarem ovelhas com histórico de aborto. No entanto, estudos recentes têm sugerido que ovinos persistentemente infectados com *T. gondii* podem transmitir a infecção congenitamente com maior freqüência que o esperado (BUXTON et al., 2007).

Recentemente, diversos artigos foram publicados por um grupo de pesquisadores na Inglaterra (DUNCANSON et al., 2001;. MORLEY et al., 2005;. WILLIAMS et al., 2005; MORLEY et al., 2007). Estes autores propuseram que transmissões transplacentárias repetidas por *T. gondii* em ovinos possam ser mais comuns do que se acreditava anteriormente.

A transmissão congênita em altas taxas de ocorrência (61%) foi encontrada em rebanhos comerciais (placenta e tecidos fetais) utilizando-se a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). O *T. gondii* foi isolado em 94% das gestações que resultaram em mortes e 42% das que vieram a termo (DUNCANSON et al., 2001).

WILLIAMS et al. (2005) detectaram altos níveis de transmissão congênita em ovelhas da raça Charollais (50,5%) e em rebanhos comerciais, sem raça definida (69%) por meio da PCR. Entretanto não foi possível comprovar se a transmissão congênita ocorreu na primoinfecção ou com a reativação da infecção crônica durante a gestação, porém os autores sugerem que em decorrência dos altos níveis de transmissão deve ter havido a reativação da toxoplasmose.

Conforme MORLEY et al. (2005), uma hipótese é que a transmissão vertical do *T. gondii* ocorre de geração em geração após uma infecção primária, resultando na manutenção de elevados níveis de infecção em algumas famílias, enquanto em outras não. Este padrão é mimetizado pela ocorrência de aborto em mesmas famílias devido à

forte correlação entre a infecção e o aborto. A crença que o *T. gondii* pode ser transmitido para os descendentes de linhagens familiares infectadas ao longo de sucessivas gerações é controversa, entretanto não deve ser descartada.

De acordo com MORLEY et al. (2007) existe um alto risco (55%) de se produzir um natimorto depois de um aborto anterior, provavelmente associado a toxoplasmose. Também é descrito que um terço dos abortos ovinos diagnosticados está relacionado à infecção toxoplásmica. O trabalho relata a necessidade de mais estudos sobre a imunidade adquirida na primoinfecção pelo *T. gondii* ao longo da vida, além da sua transmissão para a prole.

Estas pesquisas comprovam a transmissão congênita, entretanto não há um estudo detalhado sobre primoinfecção, reativação de infecção crônica ou reinfecção durante a gestação. Além disto, todos esses trabalhos baseiam-se na detecção de DNA pela PCR da placenta e tecidos fetais.

RODGER et al. (2006) falharam ao tentar detectar transmissão congênita em ovinos persistentemente infectados. Trinta e uma ovelhas naturalmente soropositivas para *T. gondii* e 15 ovelhas soronegativas foram acasaladas e controladas durante a gestação. Não foi encontrada nenhuma evidência de toxoplasmose na histopatologia ou PCR da placenta ou tecidos de cordeiros. Títulos baixos para o parasita foram encontrados em três cordeiros, mas não foi possível estabelecer se esses anticorpos representam indícios de infecção fetal.

Estudos realizados por outros autores sugerem a possibilidade da infecção transplacentária em ovelhas persistentemente infectadas com *T. gondii*. Entretanto, inexitem na literatura mundial estudos que comprovem a transmissão congênita deste protozoário em ovelhas reinfectadas, o que justificou a realização deste projeto de pesquisa. A confirmação desta via de infecção (transmissão vertical), após reinfecção, contribuirá para elucidar a elevada disseminação desta zoonose nesta espécie animal, responsável por enormes prejuízos à ovinocultura mundial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a transmissão congênita em ovelhas, infectadas e reinfectadas experimentalmente com oocistos de *T. gondii*, em três fases gestacionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1** Comprovar se a imunidade adquirida na primoinfecção protege a ovelha reinfectada contra distúrbios reprodutivos (abortos e/ou transmissão transplacentária);
- 2.2.2** Avaliar a reinfecção experimental com oocistos de *T. gondii*, em ovelhas reprodutoras, em três fases gestacionais;
- 2.2.3** Compilar dados clínicos e laboratoriais para melhor conhecimento da reinfecção toxoplásmica em ovinos;
- 2.2.4** Avaliar a resposta imune humoral das fêmeas (soro) reinfectadas e fetos (soro e/ou fluído pleural) por meio da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- 2.2.5** Pesquisar por meio de três técnicas laboratoriais (bioprova, histopatologia e PCR) a presença de *T. gondii* em amostras tissulares (SNC, pulmão, coração, fígado, baço, rins, músculo esquelético, ovário, útero e placenta) colhidas das ovelhas reinfectadas e respectivos cordeiros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

Os animais foram mantidos isolados, em cinco baias coletivas, no Setor de Ovinos – Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP – Campus de Jaboticabal.

3.2 Ovinos experimentais

Os animais (25 fêmeas e três machos) foram selecionados de um rebanho com, aproximadamente, 800 matrizes e 30 reprodutores registrados da raça Santa Inês, entre dois e quatro anos de idade, pertencentes à fazenda “Estância Santa Bárbara”, localizada no município de Monte Aprazível (20°46'22"S e 49°42'50" O), estado de São Paulo.

3.2.1. Seleção das ovelhas reprodutoras

3.2.1.1. Exames físicos

Para seleção das ovelhas experimentais foram realizados os seguintes exames físicos: frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, avaliação de linfonodos e condição corporal, entre outros.

3.2.1.2. Exames ultrassonográficos

As ovelhas selecionadas foram avaliadas por meio de ultrassonografia, objetivando descartar as gestantes.

3.2.1.3. Hemogramas

As ovelhas selecionadas foram submetidas a exames hematológicos.

3.2.1.4. Exames coproparasitológicos

Foram realizadas contagens de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG; Gordon & Whitlock, 1939), em todas as ovelhas, durante o processo de seleção.

3.2.1.5. Exames sorológicos

Foram selecionadas ovelhas negativas para toxoplasmose, neosporose, brucelose e leptospirose

3.2.2. Seleção dos ovinos reprodutores

Foram selecionados três ovinos reprodutores, da raça Santa Inês, entre dois e quatro anos de idade, negativos para toxoplasmose, neosporose, brucelose e leptospirose. Estes machos foram adquiridos da mesma propriedade de onde provieram as fêmeas selecionadas. Exames clínicos, coproparasitológicos (OPG) e hemogramas foram realizados no processo seletivo destes machos experimentais.

3.2.3. Exames sorológicos realizados para seleção dos ovinos (fêmeas e machos)

3.2.3.1. Brucelose

A Técnica do Antígeno Acidificado Tamponado, também conhecida como Teste do Rosa Bengala ou “Card Test” (ALTON *et al.*, 1988) foi empregada para brucelose (*Brucella abortus*). Nesse teste, a mesma quantidade de soro e antígeno (0,03 mL) foram colocadas em contato em placa de vidro própria. A mistura foi homogeneizada e a placa mantida em movimentos rotatórios durante quatro minutos, para observar a ocorrência, ou não, de grumos de aglutinação, indicativos da soroconversão.

3.2.3.2. Leptospirose

A Prova de Soroaglutinação Microscópica foi utilizada para o diagnóstico de leptospirose. Os soros foram testados contra 24 sorovares (*Andamana*, *Brastislava*, *Austalis*, *Butembo*, *Autumnalis*, *Castelollonis*, *Bataviae*, *Canicola*, *Whitcombi*, *Cynopteri*, *Grippotyphosa*, *Sentot*, *Hebdomadis*, *Copenhageni*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Panana*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Hardjo*, *Wolffi*, *Patoc*, *Shermani*, *Tarassovi*). O critério adotado para considerar um soro reagente foi de 50% de aglutinação no título final de 100, ou seja, metade das leptospiros aglutinadas no campo microscópico, observado no aumento de 100x. A metodologia utilizada para a realização da técnica e interpretação do grau de aglutinação seguiu de acordo com COLE et al. (1973).

3.2.3.3. Neosporose

Utilizou-se, também, a RIFI para detectar a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* (CONRAD et al. 1993), sendo os soros dos animais usados nas diluições de 1:50 e 1:100. Os ovinos com títulos sorológicos a partir de 50, foram considerados positivos (FIGLIUOLO et al., 2004) e, conseqüentemente, descartados do experimento.

3.2.3.4. Toxoplasmose

Empregou-se para detecção de anticorpos contra *T. gondii* a reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI - (CAMARGO, 1964), utilizando-se de conjugado anti-IgG específico para ovinos e caprinos (Sigma Chemical - F4891), marcado com isotiocianato de fluoresceína. Foram consideradas como amostras positivas, os soros que apresentaram títulos iguais ou superiores a 64 (SOARES et al, 2009).

3.3 Cepas de *T. gondii*

Todos os oocistos de *T. gondii* (cepa ME49 e VEG), utilizados neste trabalho, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Luís Garcia, Professor Associado de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina.

3.3.1. Cepa ME49 (primoinfecção)

A primoinfecção foi realizada utilizando-se oocistos da cepa ME49 (tipo II).

3.3.2. Cepa VEG (reinfecção)

Para a reinfecção as ovelhas primoinfectadas foram inoculadas com oocistos da cepa VEG (tipo III).

3.3.3. Cepa RH (antígenos para RIFI)

As lâminas utilizadas na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foram confeccionadas utilizando-se antígenos (taquizoítos) provenientes da cepa RH (SABIN, 1941) mantida por meio de sucessivas passagens em camundongos, no CPPAR/FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal.

3.4 Aclimatização e alimentação dos animais

Após a seleção dos ovinos, estes foram mantidos por um período de quarentena de, aproximadamente, 90 dias. Durante todo o experimento os animais receberam concentrado (OvinoTech Elite - Purina) e volumoso (silagem de milho e/ou feno). Água e sal mineral (Purinafós Ovinos) foram fornecidos “ad libitum”.

3.5 Delineamento experimental

O experimento teve duração de aproximadamente 12 meses. O dia zero foi definido como o dia em que as ovelhas (n=20) foram primoinfectadas. Após a cronificação da infecção toxoplásmica (RIFI \leq 512) as ovelhas foram alocadas com os carneiros (99 DPP) para cobertura. Após a confirmação da gestação (n=20), as 25 ovelhas utilizadas no experimento foram distribuídas em cinco grupos de cinco animais cada, sendo três reinfetados (GI: 40^o DG, GII: 80^o DG e GIII: 120^o DG), um apenas primoinfectado (GIV) e um mantido como controle negativo (GV), de acordo com o esquema abaixo:

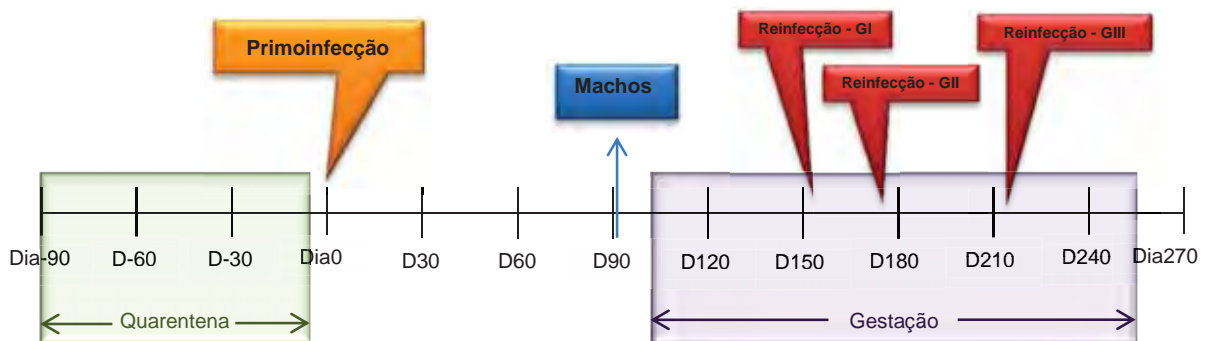


Figura 2. Esquema do delineamento experimental utilizado no estudo (CPPAR/FCAV/UNESP).

3.6 Primoinfecção por *T. gondii*

A primoinfecção foi realizada via oral utilizando-se, para cada ovino, $2,5 \times 10^3$ oocistos de *T. gondii* da cepa ME49 (tipo II - avirulenta).

Vinte ovelhas sorologicamente negativas para toxoplasmose e para outras doenças infecciosas que pudessem provocar desordens reprodutivas, como neosporose, brucelose e leptospirose, foram selecionadas, para a primoinfecção. Cinco fêmeas, sorologicamente negativas (RIFI $<$ 64) para infecção toxoplásmica constituíram o grupo controle (não infectado).

3.7 Reinfecção por *T. gondii*

Para a reinfecção das 20 ovelhas primoinfectadas com a cepa ME49, utilizou-se oocistos esporulados da Cepa VEG (tipo III), conforme o delineamento experimental abaixo:

Grupo	Número de ovinos	Título (RIFI-IgG) <i>T. gondii</i> (cepa ME49)	Dias de gestação	Oocistos de <i>T. gondii</i> (cepa VEG)	Via de inoculação
I	5	≤512	40	2,5 x10 ³	Oral
II	5	≤512	80	2,5 x10 ³	Oral
III	5	≤512	120	2,5 x10 ³	Oral
IV	5	≤512	-	-	-
V	5	Negativas	-	-	-

Os oocistos de *T. gondii* da cepa ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) foram administrados por meio de seringa acoplada a uma sonda de metal, para deposição direta no esôfago dos animais. Posteriormente a inoculação, foi administrada mais 100 mL de solução fisiológica estéril em cada animal, para lavagem das paredes da seringa e/ou sonda, onde eventualmente os oocistos poderiam estar aderidos.

3.8 Programa de sincronização de estro utilizado nas ovelhas reprodutoras

A manifestação de estro nas ovelhas reprodutoras foi induzida por meio da aplicação de hormônios conforme o protocolo descrito por MAIA (1998) modificado (Figura 3).

No dia zero, colocou-se, por meio de um aplicador, o implante intravaginal de silicone em forma de T impregnado de progesterona (Cidr[®]) e realizou-se a aplicação de cloprostenol sódico (0,5 mL). Tal hormônio promoveu uma liberação homogênea de progesterona, o que impedia as fêmeas tratadas de ovular durante este período. Este progestágeno foi retirado no 12^o dia após a sua aplicação, fazendo com que o bloqueio

da ovulação fosse interrompido bruscamente e as fêmeas entrassem numa fase folicular que daria lugar ao cio e à ovulação. Concomitantemente à retirada do implante auricular, cada ovelha recebeu, via intramuscular, 500 UI de Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG), um liberador de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). No 14º dia, os carneiros foram alocados nas baias junto com as fêmeas.

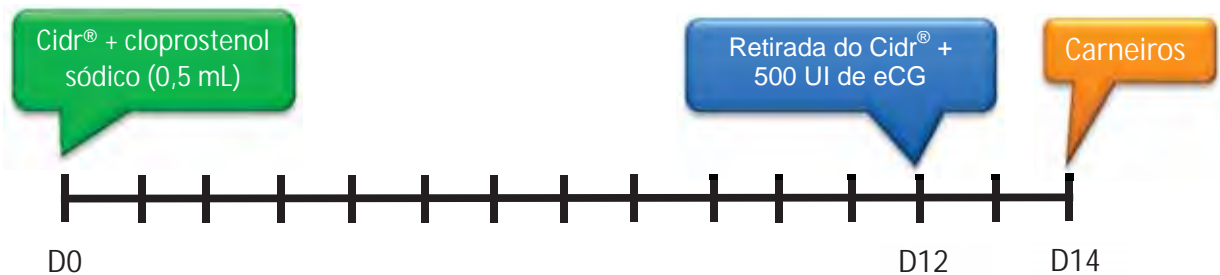


Figura 3. Esquema do protocolo hormonal utilizado na sincronização de estro de ovelhas Santa Inês (CPPAR/FCAV/UNESP).

3.9 Monta natural (machos reprodutores)

Os carneiros foram marcados com tinta vermelha e colocados juntos com as ovelhas experimentais (99 dias após a primoinfecção – Figura 4). Após vinte e um dias os reprodutores foram trocados de baias, objetivando uma maior taxa de gestação.



Figura 4. Carneiro e ovelhas marcadas com tinta vermelha.

3.10 Exames clínicos e laboratoriais

3.10.1. Parâmetros clínicos

Os parâmetros fisiológicos avaliados nas ovelhas foram frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR), aferidos, nesta ordem, com os animais à sombra, das 8:00 às 10:00 horas, a cada dois dias até o 27º pós-primoinfecção. A partir desta data, tais exames foram realizados com intervalo de sete dias até o final da gestação. Os machos reprodutores, também, foram monitorados semanalmente.

A frequência respiratória, em movimentos por minuto, foi mensurada por meio da observação dos movimentos do flanco direito do animal, durante um minuto, mantendo-se o observador a uma distância aproximada de 1,5 metros do animal. A frequência cardíaca, em batimentos por minuto, foi obtida com a utilização de um estetoscópio posicionado entre o terceiro e quarto espaço intercostal, próximo à articulação costovertebral, durante um minuto. A temperatura retal (°C) foi obtida por meio de termômetro clínico veterinário digital, mantido no reto do animal, até o disparo do sonorizador.

3.10.2. Exames ultrassonográficos

As ovelhas experimentais foram avaliadas por meio de ultrassonografia para a confirmação da gestação. Após as reinfecções, os animais foram submetidos à ultrassonografia (transabdominal) quinzenal, para avaliar a evolução da gestação, bem como para detectar eventuais alterações ou perdas fetais que pudessem passar despercebidas às observações clínicas.

3.10.3. Resposta Imune-humoral

Nos soros, de todas as ovelhas, obtidos de amostras sanguíneas colhidas sete dias antes da primoinfecção, imediatamente antes da primoinfecção, a cada três dias até o 30º dia após a primoinfecção e, semanalmente, até o fim da gestação, foram

pesquisados anticorpos contra *T. gondii* da classe IgG, pela RIFI (CAMARGO, 1964). Quinzenalmente, essas ovelhas foram submetidas a exames sorológicos para as seguintes enfermidades: brucelose, leptospirose e neosporose. Também foi realizada a sorologia nos fetos, utilizando o fluído pleural ou soro, considerando positividade títulos acima de 32 (BUXTON et al., 2006). Nos cordeiros nascidos vivos e saudáveis, também, foram realizadas colheitas sanguíneas na hora do nascimento, 3º e 14º (eutanásia) dia de idade. Os três carneiros experimentais foram sorologicamente avaliados (brucelose, leptospirose, neosporose e toxoplasmose) a cada 15 dias.

3.10.3.1. Obtenção de antígenos de *T. gondii* para confecção das lâminas

Foi utilizada a cepa “RH” (SABIN, 1941), mantida por meio de periódicas replicações intraperitoneais de taquizoítos em camundongos suíços albinos (*Mus musculus*) de 20 a 25 g de peso, pertencente ao Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CCPAR/FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal.

Para a produção dos antígenos, foram inoculados intraperitonealmente 0,5 mL da cepa RH em cada camundongo. Após três dias os animais foram sacrificados com éter etílico e os taquizoítos foram obtidos do lavado intraperitoneal com solução salina estéril.

Suspensões de taquizoítos e células foram centrifugados a 200g por 30 segundos, para a sedimentação das células e os taquizoítos foram recuperados por inversão. Posteriormente, foram realizadas mais três lavagens, com solução salina 0,8% estéril, a 300g por 10 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. Após as lavagens os taquizoítos foram inativados com PBS + formol a 1%, por 10 minutos à temperatura ambiente (24°C). Em seguida à inativação, a suspensão foi lavada novamente por quatro vezes com solução salina 0,9% estéril, por meio de centrifugações consecutivas a 300g por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em salina 0,9% estéril, acrescida de BSA 0,1% e examinado por meio de microscopia óptica com objetiva de 40X, até se obter uma concentração de 20 a 30 taquizoítos por campo. Dez µL dessa suspensão foram colocados em “poços” (impressos em lâminas de microscopia pela técnica de “Silk

Screen”). As lâminas contendo o antígeno foram mantidas a temperatura ambiente, durante a noite, para secarem. Posteriormente, as mesmas foram acondicionadas em caixas apropriadas e armazenadas a -20°C , até a utilização.

3.10.4. Pesquisa de *T. gondii* em amostras teciduais

3.10.4.1. Bioensaio em camundongos

Amostras teciduais colhidas, inclusive do grupo controle, foram inoculadas em camundongos conforme a metodologia descrita por DUBEY (1998).

Os tecidos foram primeiramente cortados em pequenos fragmentos, sendo removidos o tecido conectivo e a gordura. A placenta, útero e ovário foram avaliadas integralmente, enquanto que para os demais órgãos utilizou-se um “pool”. O “pool” de tecidos foi homogeneizado com cinco volumes de NaCl 0,15M (salina) utilizando-se um homogenizador de uso doméstico.

Após homogeneização adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1 – 1,2 (pepsina, 2,6g; HCl, 7,0mL; água destilada suficiente para 500mL de solução), recém preparada e aquecida em banho-maria a 37°C . A mistura foi incubada em estufa a 37°C , por uma hora, com agitador magnético.

Após a incubação, a suspensão foi coada por meio de duas camadas de gaze, o coado foi transferido para cinco tubos cônicos de 50mL e centrifugado a 1.200g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada tubo foi então neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH 8,3, recém-preparado (ao redor de 5,0mL por tubo). A neutralização foi percebida visualmente pela mudança de cor do sedimento. Após homogeneização, o material foi transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 50mL com salina, e centrifugado a 1.200g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado com salina (v/v) contendo 2000UI de penicilina e 200ug de estreptomicina por mililitro.

Imediatamente cada amostra de cada animal foi inoculada em grupo de 15 camundongos. Esses camundongos inoculados (1mL/camundongo) foram observados diariamente, por seis semanas (COSTA et al., 1977), para a avaliação da presença de

sinais clínicos da toxoplasmose. Os camundongos sobreviventes foram eutanasiados (AVMA, 2007) para pesquisa de anticorpos (RIFI) e de cistos cerebrais de *T. gondii*, em amostras de soros e cérebros, respectivamente.

3.10.4.2. Histopatologia

Para realização de exame histopatológico os tecidos (medula, encéfalo, pulmão, coração, fígado, baço, rins, retina, glândula mamária, músculo esquelético, ovário, útero e placenta) foram fixados em formol tamponado com fosfatos (pH 7,2) a 10%, por período de 48 horas, sendo transferidos posteriormente para solução de álcool 70%. Em seguida, o material foi processado, incluído em parafina histológica, cortados a 5 µm e corados com hematoxilina e eosina.

3.10.4.3. Detecção do DNA de *T. gondii* pela PCR

Os tecidos (medula, encéfalo, pulmão, coração, fígado, baço, rins, retina, glândula mamária, músculo esquelético, ovário, útero e placenta) colhidos foram congelados a -20°C e posteriormente, processados de acordo com a técnica descrita por FUENTES et al. (1996).

3.10.4.3.1. Extração do DNA das amostras

A extração de DNA de *T. gondii* das amostras avaliadas e do controle positivo foi realizada segundo recomendações do fabricante do kit “DNeasy Blood & Tissues Kit” (Quiagen, USA).

3.10.4.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em Cadeia pela Polimerase foi realizada de acordo com a técnica descrita por FUENTES et al. (1996). Para a detecção do DNA de *T. gondii* nas amostras

teciduais foi amplificado um fragmento do gene B1 de 194 pares de base (bp), utilizando-se os “primers” 5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3' (B₁) e 5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3' (B₂), descritos por BURG et al. (1989) e FUENTES et al. (1996). 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 MgCl₂, 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.

3.10.4.3.3. Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados pela técnica da PCR

A análise dos materiais amplificados (15µL) foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão de TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 0,1 mM), corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e observados em trans-iluminador de luz ultra-violeta, a fim de identificar a presença, ou não, do fragmento 194 pb característica do *T. gondii*.

3.11 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em parcela subdividida no tempo (“Split Plot in Time”), considerando-se os inoculados e controle. Foram aplicados os testes F para efeito de tratamentos e teste t para as comparações entre os tratamentos (SAS, 2001).

4 RESULTADOS

4.1 Seleção dos ovinos

Para a seleção das 25 ovelhas, foram realizados os exames descritos no item 3.3.1, em 54 fêmeas, pertencentes à Estância Santa Bárbara. As 25 ovelhas selecionadas, negativas para toxoplasmose, neosporose, brucelose e leptospirose, apresentavam exames clínicos (frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, avaliação de linfonodos e condição corporal, entre outros) e hematológicos dentro da normalidade. Por meio de ultrassonografia, foi possível selecionar apenas as ovelhas que não estavam gestantes. Estas ovelhas também foram submetidas a contagens de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG; Gordon & Whitlock, 1939), sendo selecionadas apenas animais com contagem inferior a 500 ovos.

Três ovinos reprodutores, negativos para toxoplasmose, neosporose, brucelose e leptospirose foram selecionados, da mesma propriedade de onde provieram as fêmeas. Estes machos apresentavam exames clínicos e hemogramas dentro da normalidade. Exames coproparasitológicos (OPG) foram realizados no processo seletivo destes machos experimentais, sendo selecionados apenas animais com contagem inferior a 500 ovos.

4.2 Obtenção de taquizoítos de *T. gondii*

Após padronização da técnica para manutenção da cepa "RH" de *T.gondii* em camundongos, foi possível obter de lavados peritoneais ricos em taquizoítos, que foram utilizados como antígenos na confecção de lâminas para a RIFI.

4.3 Primoinfecção e reinfecção por *T. gondii*

A primoinfecção, nas 20 ovelhas selecionadas, foi realizada utilizando-se $2,5 \times 10^3$ oocistos de *T. gondii* da cepa ME49 (tipo II), para cada ovelha.

As ovelhas (n=15) pertencentes aos grupos I, II e III foram reinfectadas com *T. gondii* e distribuídas conforme o delineamento experimental abaixo:

Grupo	Nº de ovinos	Título (RIFI-IgG) <i>T. gondii</i> (cepa ME49)	Dias de gestação	Datas pós-primoinfecção	Oocistos de <i>T. gondii</i> (cepa VEG)	Via de inoculação
I	5	≤512	40	163	2,5 x10 ³	Oral
II	5	≤512	80	179	2,5 x10 ³	Oral
III	5	≤512	120	219	2,5 x10 ³	Oral
IV	5	≤512	-	-	-	-
V	5	Negativas	-	-	-	-

4.4 Exames clínicos

Os resultados referentes aos parâmetros clínicos avaliados, frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal, estão sumarizados nas Tabelas 3, 4 e 5 e Figuras 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 2. Frequências cardíacas mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

Datas pós-primoinfecção	Grupos Experimentais / Médias e Desvios Padrões*										Análise de Variância	
	GI: Reinoculação com 40 dias de gestação		GII: Reinoculação com 80 dias de gestação		GIII: Reinoculação com 120 dias de gestação		GIV: Controle positivo (apenas primoinfectadas)		GV: Controle negativo		Valor de F	Pr > F
-7	84,0 ± 17,2	Aghij	84,8 ± 20,3	Ahijklmn	80,0 ± 16,2	Aijk	92,8 ± 14,8	Acdefgh	97,2 ± 9,0	Aa	1,26	0,2837
0	72,0 ± 8,0	Aj	81,6 ± 14,0	Ajklmn	88,8 ± 20,3	Adefghijk	84,8 ± 18,8	Afghijk	96,0 ± 2,4	Aa	1,86	0,1158
3	81,6 ± 7,3	ABhij	78,4 ± 3,6	Bklmn	102,4 ± 17,6	Abcdefg	84,8 ± 17,1	ABfghijk	96,8 ± 7,3	ABa	2,50	0,0409
5	83,2 ± 5,2	Aghij	85,6 ± 10,8	Ahijklmn	80,8 ± 5,2	Aijk	87,2 ± 7,2	Aefghij	100,8 ± 1,8	Aa	1,44	0,2197
7	77,6 ± 6,7	Bij	82,4 ± 10,8	Bijklmn	72,8 ± 1,8	Bk	79,2 ± 7,7	Bhijklm	100,0 ± 8,1	Aa	2,56	0,0370
9	109,6 ± 12,5	Aabc	112,0 ± 21,9	Abcde	107,2 ± 18,2	Abcd	110,4 ± 14,3	Abc	97,6 ± 7,8	Aa	0,77	0,5435
11	94,4 ± 17,1	Acdefghi	93,6 ± 9,2	Afghijkl	89,6 ± 16,6	Adefghijk	92,0 ± 17,2	Adefghi	98,8 ± 5,9	Aa	0,27	0,8960
13	84,8 ± 11,5	ABghij	68,8 ± 11,8	Bn	80,8 ± 4,4	ABijk	76,0 ± 9,8	Bijklm	98,0 ± 6,5	Aa	2,80	0,0251
15	77,6 ± 10,8	Aij	81,6 ± 15,1	Ajklmn	78,4 ± 6,7	Ajk	83,2 ± 7,2	Aghijkl	95,6 ± 5,0	Aa	1,24	0,2918
17	94,4 ± 10,0	Acdefghi	84,0 ± 7,5	Ahijklmn	90,4 ± 12,2	Adefghijk	87,2 ± 10,7	Aefghij	97,2 ± 9,4	Aa	0,67	0,6154
19	92,0 ± 18,3	Acdefghi	80,8 ± 15,8	Ajklmn	92,8 ± 13,1	Acdefghij	96,0 ± 13,3	Acdefgh	97,2 ± 7,8	Aa	0,99	0,4096
21	89,6 ± 6,7	Aefghij	80,8 ± 12,5	Ajklmn	84,8 ± 10,4	Aghijk	83,2 ± 6,6	Aghijkl	98,0 ± 7,9	Aa	1,09	0,3600
23	92,8 ± 8,2	Acdefghi	90,4 ± 11,2	Aghijkl	95,2 ± 7,7	Abdefghij	101,6 ± 4,6	Acdef	101,2 ± 9,9	Aa	0,59	0,6692
25	98,4 ± 6,1	Abcdefgh	98,4 ± 6,1	Aefghij	92,0 ± 9,4	Acdefghij	93,6 ± 8,3	Acdefgh	98,4 ± 7,4	Aa	0,23	0,9221
27	94,4 ± 6,7	Acdefghi	96,8 ± 8,2	Aefghij	86,4 ± 6,1	Afghijk	88,0 ± 7,5	Aefghij	99,2 ± 6,7	Aa	0,73	0,5737
30	81,6 ± 9,2	Ahij	90,4 ± 6,1	Aghijkl	93,6 ± 4,6	Acdefghij	91,2 ± 5,9	Adefghij	98,4 ± 4,8	Aa	0,89	0,4722
37	88,8 ± 10,4	Afghij	82,4 ± 11,5	Aijklmn	80,0 ± 9,4	Aijk	86,4 ± 10,8	Aefghij	98,4 ± 6,5	Aa	1,20	0,3097
44	88,8 ± 11,1	Afghij	90,4 ± 12,2	Aghijkl	93,6 ± 6,1	Acdefghij	88,8 ± 13,1	Adefghij	100,0 ± 6,3	Aa	0,52	0,7176
51	83,2 ± 7,2	Bghij	72,8 ± 11,8	Bmn	81,6 ± 7,8	Bhijk	74,4 ± 5,4	Bijklm	100,8 ± 10,6	Aa	2,92	0,0204
58	120,8 ± 17,1	Aa	109,6 ± 18,2	Acdef	96,8 ± 8,7	Abcdefghi	98,4 ± 14,0	Acdefg	102,0 ± 9,1	Aa	2,29	0,0578
65	114,4 ± 18,2	ABab	130,4 ± 25,2	Aa	109,6 ± 13,4	Bbc	124,8 ± 31,0	ABab	102,0 ± 4,9	Ba	3,09	0,0154
72	108,8 ± 20,9	Aabcd	117,6 ± 26,3	Aabcd	105,6 ± 26,0	Abcde	102,4 ± 11,5	Acdef	106,2 ± 6,6	Aa	0,78	0,5357
79	109,6 ± 14,0	Aabc	127,2 ± 27,8	Aabc	112,0 ± 18,3	Aab	106,4 ± 6,1	Acd	101,2 ± 5,2	Aa	2,25	0,0618
86	107,2 ± 17,8	Aabcde	84,0 ± 12,6	Ahijklmn	104,8 ± 9,1	Abcde	92,0 ± 11,3	Adefghi	97,2 ± 4,4	Aa	2,11	0,0771
93	104,8 ± 14,3	ABbcdefg	89,6 ± 17,6	ABabc	105,6 ± 12,8	Acdefghij	86,4 ± 14,6	Bcde	97,6 ± 4,3	ABa	3,75	0,0049
100	100,4 ± 11,2	Acdefghi	125,6 ± 26,3	Aghijklm	92,8 ± 10,4	Acdefghij	103,2 ± 20,3	Aefghij	98,4 ± 6,2	Aa	0,40	0,8096
107	92,8 ± 22,2	Aghij	89,6 ± 13,4	Afghijkl	93,6 ± 13,7	Abcdefghi	87,2 ± 19,1	Aefghij	98,0 ± 6,0	Aa	1,04	0,3856
114	83,2 ± 23,0	Aabcdef	93,6 ± 19,1	Aghijklm	96,8 ± 13,7	Abcde	88,0 ± 16,2	Aefghij	99,6 ± 7,0	Aa	1,78	0,1308
121	96,8 ± 16,1	Aefghij	92,8 ± 22,9	Aefghijk	84,8 ± 10,0	Adefghijk	96,8 ± 23,6	Acdefgh	98,8 ± 5,8	Aa	0,35	0,8442
128	86,4 ± 7,8	Abcdefgh	90,4 ± 8,3	Afghijkl	104,0 ± 13,9	Aghijk	92,8 ± 14,3	Acdefgh	96,8 ± 6,4	Aa	0,74	0,5681
135	94,4 ± 18,5	Aghij	89,6 ± 13,4	Aghijkl	89,6 ± 19,1	Abcdef	91,2 ± 17,8	Acdefghi	100,2 ± 6,2	Aa	1,06	0,3751
142	115,2 ± 14,3	Acdefghi	129,6 ± 20,5	Aghijklm	128,0 ± 18,8	Adefghijk	137,2 ± 20,9	Adefghij	107,8 ± 5,5	Aa	0,47	0,7562
149	123,2 ± 17,3	ABab	130,4 ± 11,5	ABab	128,8 ± 19,5	ABa	140,8 ± 18,2	Aa	104,8 ± 7,9	Ba	3,30	0,0107
156	92,0 ± 13,3	ABa	94,4 ± 7,3	Aa	88,8 ± 3,3	Ba	94,4 ± 19,7	Aa	98,8 ± 3,3	ABa	4,14	0,0025
163	92,0 ± 14,4	Acdefghi	92,0 ± 8,5	Aefghijkl	104,0 ± 8,0	Adefghijk	96,0 ± 6,9	Acdefgh	98,8 ± 7,4	Aa	0,32	0,8664
170	86,4 ± 10,8	Aefghij	89,6 ± 11,2	Afghijkl	99,2 ± 18,6	Abcdef	96,4 ± 4,1	Acdefgh	98,4 ± 7,7	Aa	0,60	0,6610
177	89,6 ± 6,7	Aghij	96,0 ± 2,8	Aghijklm	90,4 ± 7,8	Abcdefgh	94,4 ± 6,7	Acdefgh	98,8 ± 11,5	Aa	0,76	0,5504
184	91,2 ± 8,7	Adefghi	104,0 ± 5,7	Adefg	82,4 ± 6,1	Ahijk	95,2 ± 9,5	Acdefgh	97,2 ± 5,4	Aa	1,50	0,2011
191	91,2 ± 6,6	Adefghi	91,2 ± 6,6	Aghijkl	97,6 ± 10,0	Abcdefghi	96,0 ± 4,6	Ajklm	98,4 ± 7,1	Aa	1,94	0,1016
198	92,8 ± 14,3	Acdefghi	92,0 ± 8,5	Afghijkl	92,0 ± 6,3	Acdefghij	103,0 ± 6,8	Ahijklm	99,2 ± 6,1	Aa	1,10	0,3560
205	98,4 ± 8,3	Abcdefgh	101,6 ± 4,6	Adefgh	93,6 ± 11,5	Acdefghij	101,0 ± 9,5	Aijklm	98,0 ± 8,7	Aa	2,25	0,0619
212	92,0 ± 12,6	Acdefghi	96,8 ± 7,7	Aefghij	93,6 ± 8,3	Acdefghij	97,0 ± 8,2	Aijklm	98,0 ± 5,1	Aa	1,57	0,1804
219	93,6 ± 12,5	ABcdefghi	96,0 ± 8,0	ABefghijk	95,2 ± 11,1	ABbcdefghij	90,7 ± 12,9	Bmn	98,0 ± 7,5	Aa	4,27	0,0020
226	92,8 ± 8,2	Acdefghi	85,6 ± 11,5	Ahijklmn	95,2 ± 13,7	Abcdefghij	90,7 ± 4,6	Almn	98,4 ± 6,2	Aa	3,35	0,0098
233	94,4 ± 4,6	Acdefghi	88,8 ± 5,2	Aghijklmn	96,0 ± 11,0	Abcdefghi	96,0 ± 4,0	Ajklmn	100,4 ± 7,1	Aa	2,29	0,0581
240	98,4 ± 8,8	Abcdefgh	92,8 ± 5,2	Afghijkl	93,6 ± 10,8	Abcdefghij	97,3 ± 2,3	Ajklm	99,6 ± 5,2	Aa	2,13	0,0757
247	89,6 ± 13,4	Aefghij	100,0 ± 9,8	Adefghi	103,2 ± 14,3	Abcdef	86,7 ± 6,1	Aklmn	98,0 ± 5,7	Aa	4,49	0,0014
254	97,6 ± 24,8	Abcdefgh	76,8 ± 8,7	Bmn	76,0 ± 9,4	Bjk	69,3 ± 12,2	Bn	97,2 ± 2,7	Aa	7,03	<0,0001
Valor de F	2,85		5,27		3,11		5,88		0,13			
Pr > F	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001		1,0000			

*: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t (p>0,05)

Figura 5. "Box plot" das frequências cardíacas mensuradas nas ovelhas primoinfectadas (cepa ME49) e reinfectadas com $2,5 \times 10^3$ oocistos da cepa VEG de *Toxoplasma gondii*, pertencentes aos GI, GII e GIII; ovelhas apenas primoinfectadas (cepa ME49) – GIV; e ovelhas pertencentes ao grupo controle negativo (não infectado) - GV.

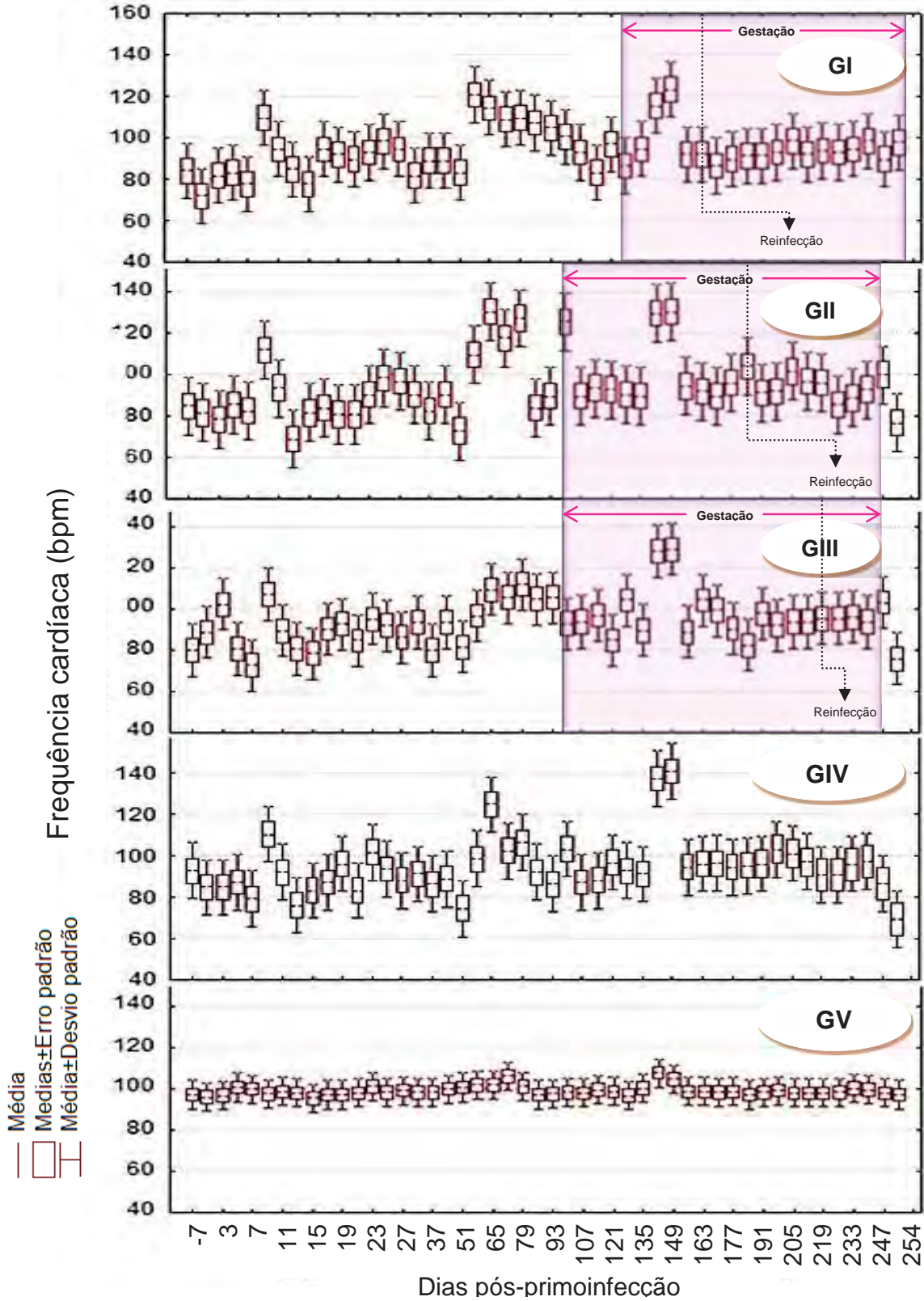


Figura 4. Frequências cardíacas mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

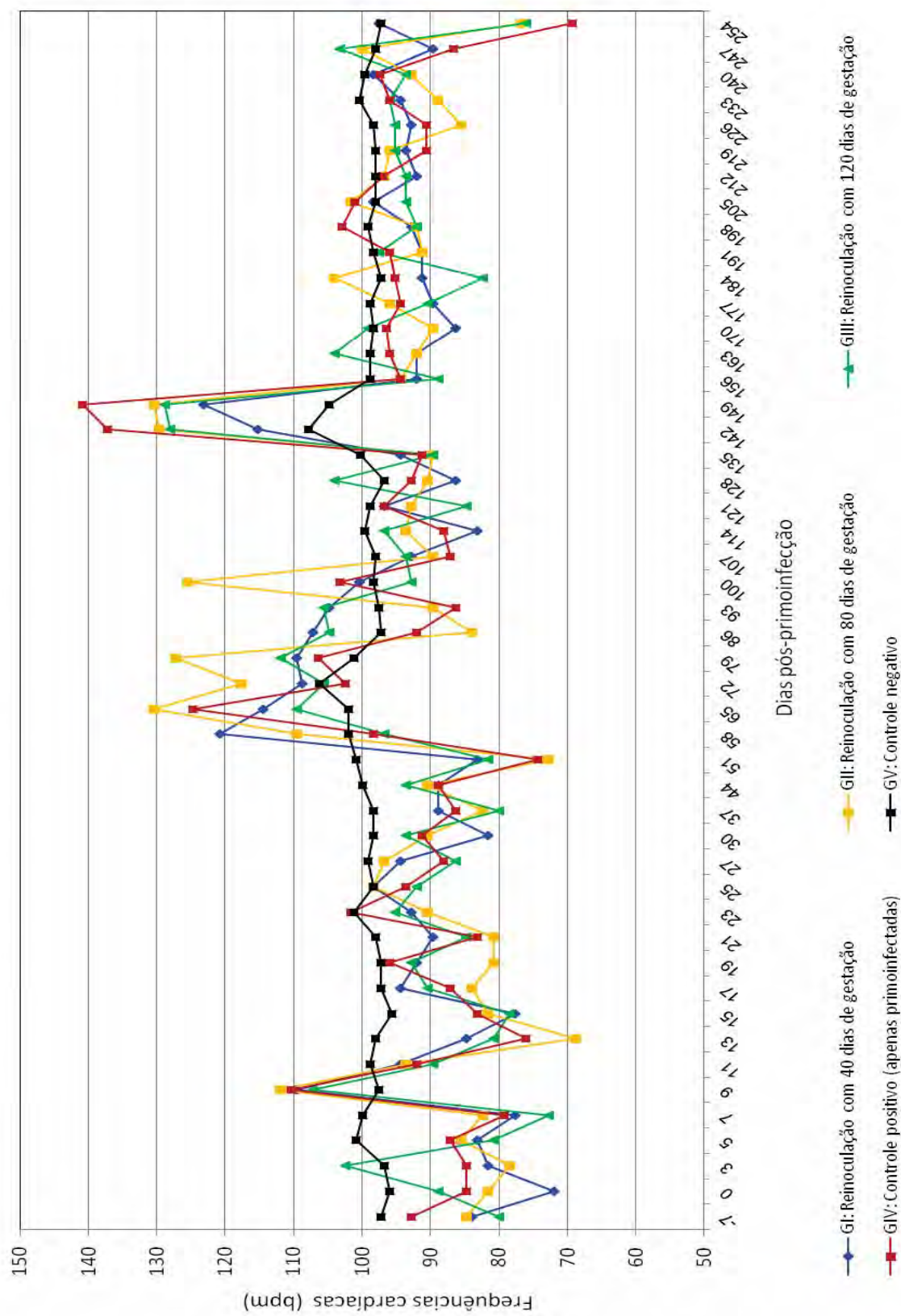


Tabela 3. Frequências respiratórias mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

Datas pós-primoinfecção	Grupos Experimentais / Médias e Desvios Padrões*												Análise de Variância				
	GI: Reinoculação com 40 dias de gestação		GII: Reinoculação com 80 dias de gestação		GIII: Reinoculação com 120 dias de gestação		GIV: Controle positivo (apenas primoinfectadas)		GV: Controle negativo		Valor de F	Pr > F					
-7	101,60	± 29,20	Aa	92,00	± 30,46	Aab	91,20	± 27,48	Aab	92,00	± 33,47	Aa	98,00	± 9,70	Aa	0,14	0,9646
0	88,00	± 6,32	Aa	93,60	± 20,12	Aa	96,80	± 28,06	Aa	92,00	± 25,77	Aa	97,00	± 12,21	Aa	0,17	0,9511
3	72,80	± 5,22	Aabc	72,00	± 4,00	Ab	80,80	± 17,98	Aab	72,80	± 9,12	Aa	84,00	± 5,83	Aa	1,58	0,2179
5	73,60	± 7,27	Aabc	75,20	± 7,16	Aab	72,00	± 7,48	Aab	69,60	± 3,58	Aa	79,20	± 12,54	Aa	0,98	0,4385
7	68,80	± 3,35	Abcde	72,00	± 2,83	Ab	65,60	± 6,07	Abc	67,20	± 7,16	Aa	71,20	± 6,72	Aa	1,18	0,3513
9	78,40	± 13,45	Aab	89,60	± 16,64	Aab	90,40	± 16,64	Aab	92,00	± 12,33	Aa	91,60	± 6,39	Aa	0,87	0,5007
11	69,60	± 22,91	Abcde	76,80	± 7,16	Aab	69,60	± 10,81	Aabc	70,40	± 9,21	Aa	70,40	± 10,71	Aa	0,26	0,8979
13	51,20	± 14,25	Aefg	67,20	± 12,13	Abcd	59,20	± 13,08	Acde	64,00	± 20,98	Aab	64,00	± 3,74	Aa	1,00	0,4321
15	54,40	± 17,80	Adefg	57,60	± 18,02	Adefg	50,40	± 18,24	Adefg	65,60	± 10,43	Aab	64,80	± 4,15	Aa	0,98	0,4385
17	65,60	± 12,52	Abcde	56,80	± 13,68	Adefg	60,00	± 20,59	Acde	55,20	± 12,13	Ab	69,60	± 4,56	Aa	0,98	0,4418
19	73,60	± 8,76	Aabc	54,40	± 15,90	Bdefg	74,40	± 10,81	Aab	69,60	± 6,07	ABa	67,20	± 4,38	ABa	3,24	0,0334
21	57,60	± 19,92	Aadefg	46,40	± 10,04	Aefgh	54,40	± 16,15	Acde	58,40	± 12,20	Aab	65,60	± 6,07	Aa	1,28	0,3092
23	69,60	± 14,31	Abcde	64,00	± 9,38	Abcd	70,40	± 16,15	Aabc	80,80	± 11,80	Aa	72,80	± 8,67	Aa	1,21	0,3358
25	71,20	± 18,20	Abcd	59,20	± 10,35	Adef	60,00	± 16,25	Acde	65,60	± 15,13	Aab	69,60	± 3,58	Aa	0,78	0,5485
27	69,60	± 16,15	Abcde	79,20	± 8,67	Aab	60,00	± 8,49	Acde	68,00	± 8,00	Aa	71,20	± 9,55	Aa	2,10	0,1184
30	52,00	± 14,14	Aefg	60,00	± 18,11	Acdef	61,60	± 8,76	Acde	72,00	± 12,33	Aa	70,00	± 5,29	Aa	2,09	0,1207
37	64,00	± 23,49	Acdef	57,60	± 9,21	Adefg	53,60	± 18,46	Adef	63,20	± 18,85	Aab	70,00	± 6,00	Aa	0,73	0,585
44	65,60	± 20,12	Abcde	63,20	± 6,57	Abcd	60,00	± 12,00	Acde	56,00	± 11,66	Ab	69,60	± 5,90	Aa	0,89	0,4895
51	50,40	± 11,52	ABefg	44,80	± 16,10	Befghi	44,00	± 10,20	Befg	56,80	± 10,35	ABb	68,00	± 6,78	Aa	3,80	0,0187
58	37,60	± 7,27	Bfg	32,80	± 8,67	Bhijk	35,20	± 9,55	Bfgh	36,00	± 11,31	Bcd	68,80	± 3,35	Aa	15,77	<0,0001
65	40,00	± 10,58	Bfg	40,00	± 9,38	Bfghi	46,40	± 4,56	Befg	37,60	± 3,58	Bc	70,40	± 8,05	Aa	15,38	<0,0001
72	38,40	± 7,27	Bfg	39,20	± 7,69	Bfghi	40,00	± 4,00	Befg	36,80	± 10,35	Bcd	70,80	± 10,35	Aa	15,24	<0,0001
79	32,00	± 6,32	Bgh	34,40	± 6,69	Bhij	30,40	± 6,07	Bh	32,00	± 2,83	Bd	68,80	± 5,22	Aa	43,04	<0,0001
86	35,20	± 8,67	Bgh	28,00	± 6,32	Bijk	35,20	± 6,57	Bfgh	27,20	± 5,93	Bd	69,60	± 4,56	Aa	35,72	<0,0001
93	29,60	± 2,19	Bgh	25,60	± 4,56	Bk	33,60	± 4,56	Bgh	28,40	± 6,99	Bd	72,80	± 5,02	Aa	80,30	<0,0001
100	32,00	± 8,94	Bgh	39,20	± 5,93	Bfghi	31,40	± 8,35	Bh	32,80	± 8,67	Bcd	68,80	± 6,42	Aa	21,08	<0,0001
107	28,80	± 5,93	Bh	27,20	± 5,22	Bjk	29,60	± 4,56	Bh	28,80	± 7,16	Bd	68,00	± 5,10	Aa	48,51	<0,0001
114	28,80	± 9,12	Bh	28,00	± 6,32	Bjk	28,80	± 4,38	Bh	28,80	± 7,16	Bd	69,20	± 4,38	Aa	38,74	<0,0001
121	28,00	± 2,83	Bh	27,20	± 6,57	Bjk	26,40	± 4,56	Bh	29,60	± 6,69	Bd	68,80	± 3,35	Aa	65,94	<0,0001
128	54,40	± 10,81	Bdefg	69,60	± 4,56	Bb	56,80	± 6,57	Bode	57,60	± 7,80	Bab	68,00	± 4,00	Aa	4,74	0,0075
135	62,40	± 11,52	Acdef	62,40	± 12,20	Abcde	66,40	± 10,81	Abc	64,80	± 10,35	Aab	68,80	± 3,35	Aa	0,36	0,8325
142	33,60	± 4,56	Bgh	33,60	± 4,56	Bhij	33,60	± 4,56	Bgh	32,80	± 6,57	Bcd	67,20	± 3,35	Aa	48,93	<0,0001
149	31,20	± 1,79	Bgh	36,00	± 8,49	Bghij	36,00	± 10,95	Bfgh	40,00	± 7,48	Bc	67,20	± 3,35	Aa	19,71	<0,0001
156	57,60	± 11,17	Aadefg	52,00	± 7,48	Aefg	60,40	± 11,35	Acde	62,40	± 10,81	Aab	67,60	± 4,56	Aa	1,86	0,1561
163	57,60	± 15,13	Aadefg	62,40	± 9,21	Abcde	65,60	± 14,59	Abcd	66,40	± 15,13	Aab	68,40	± 4,10	Aa	0,58	0,6832
170	56,00	± 11,66	Aadefg	56,00	± 9,38	Adefg	63,60	± 16,27	Abcd	62,40	± 11,52	Aab	68,80	± 3,35	Aa	1,17	0,3519
177	58,40	± 9,63	Acdef	65,60	± 6,07	Abcd	56,80	± 8,67	Acde	60,00	± 7,48	Aab	68,00	± 4,00	Aa	2,09	0,1198
184	61,60	± 9,63	ABcdef	71,20	± 4,38	Ab	51,20	± 9,55	Bdef	64,80	± 8,67	Aab	68,00	± 6,16	Aa	4,66	0,0080
191	68,00	± 4,69	Abcde	64,00	± 4,00	Abcd	63,60	± 9,84	Abcd	67,00	± 5,03	Aa	66,80	± 3,90	Aa	0,53	0,7156
198	61,60	± 8,76	Acdef	63,20	± 13,39	Abcde	60,80	± 11,80	Acde	76,00	± 8,00	Aa	68,00	± 4,00	Aa	1,77	0,1762
205	63,20	± 11,10	Acdef	68,80	± 8,67	Abc	57,60	± 15,90	Acde	61,00	± 11,94	Aab	68,00	± 4,00	Aa	0,91	0,4797
212	60,80	± 11,80	Acdef	66,40	± 4,56	Abcd	60,80	± 9,96	Acde	67,00	± 5,03	Aa	68,80	± 6,42	Aa	1,01	0,4268
219	62,40	± 9,21	Acdef	64,80	± 6,57	Abcd	62,40	± 13,15	Abcd	62,67	± 12,86	Aab	65,60	± 4,34	Aa	0,12	0,9722
226	58,40	± 11,87	Acdef	59,20	± 11,10	Adef	65,60	± 9,63	Abcd	56,00	± 12,00	Ab	68,00	± 5,10	Aa	1,03	0,4206
233	62,00	± 8,72	Acdef	61,60	± 9,21	Acde	64,00	± 9,38	Abcd	62,67	± 2,31	Aab	68,40	± 6,99	Aa	0,35	0,8374
240	66,40	± 5,37	Abcde	59,60	± 6,69	Acdef	54,40	± 12,20	Acde	64,00	± 4,00	Aab	67,60	± 7,13	Aa	1,64	0,2075
247	65,60	± 6,07	Bbcde	83,60	± 10,43	Aab	70,80	± 5,22	ABab	80,00	± 4,00	Aa	68,00	± 5,10	ABa	5,36	0,0051
254	76,80	± 21,05	Aabc	66,40	± 6,07	Abcd	70,40	± 2,19	Aabc	60,00	± 17,44	Aab	66,80	± 6,87	Aa	0,65	0,6354
Valor de F	4,49		5,05		4,35		10,21		0,84								
Pr > F	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001		0,7764								

*: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t (p>0,05)

Figura 7. "Box plot" das frequências respiratórias mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

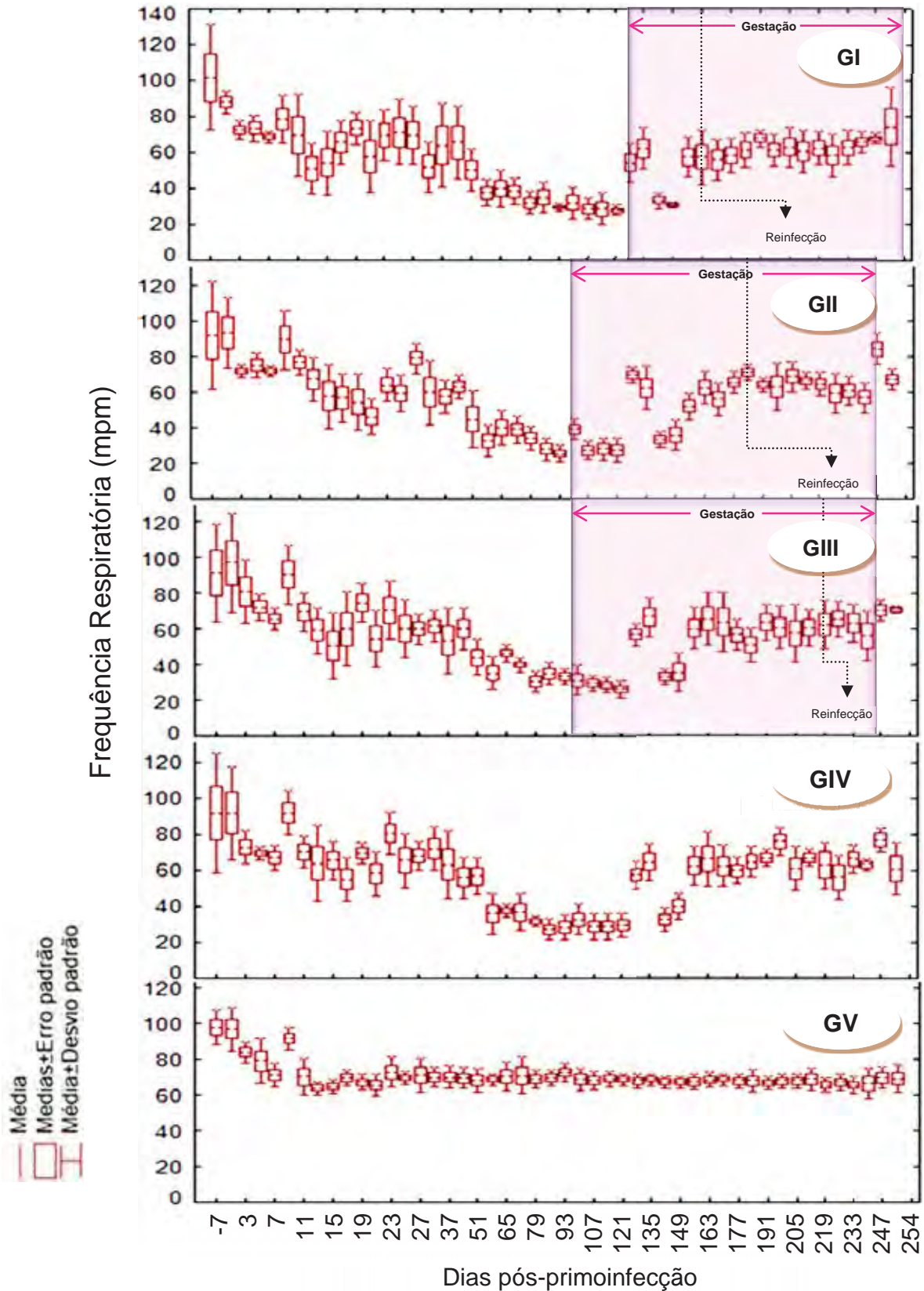


Figura 6. Frequências respiratórias mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

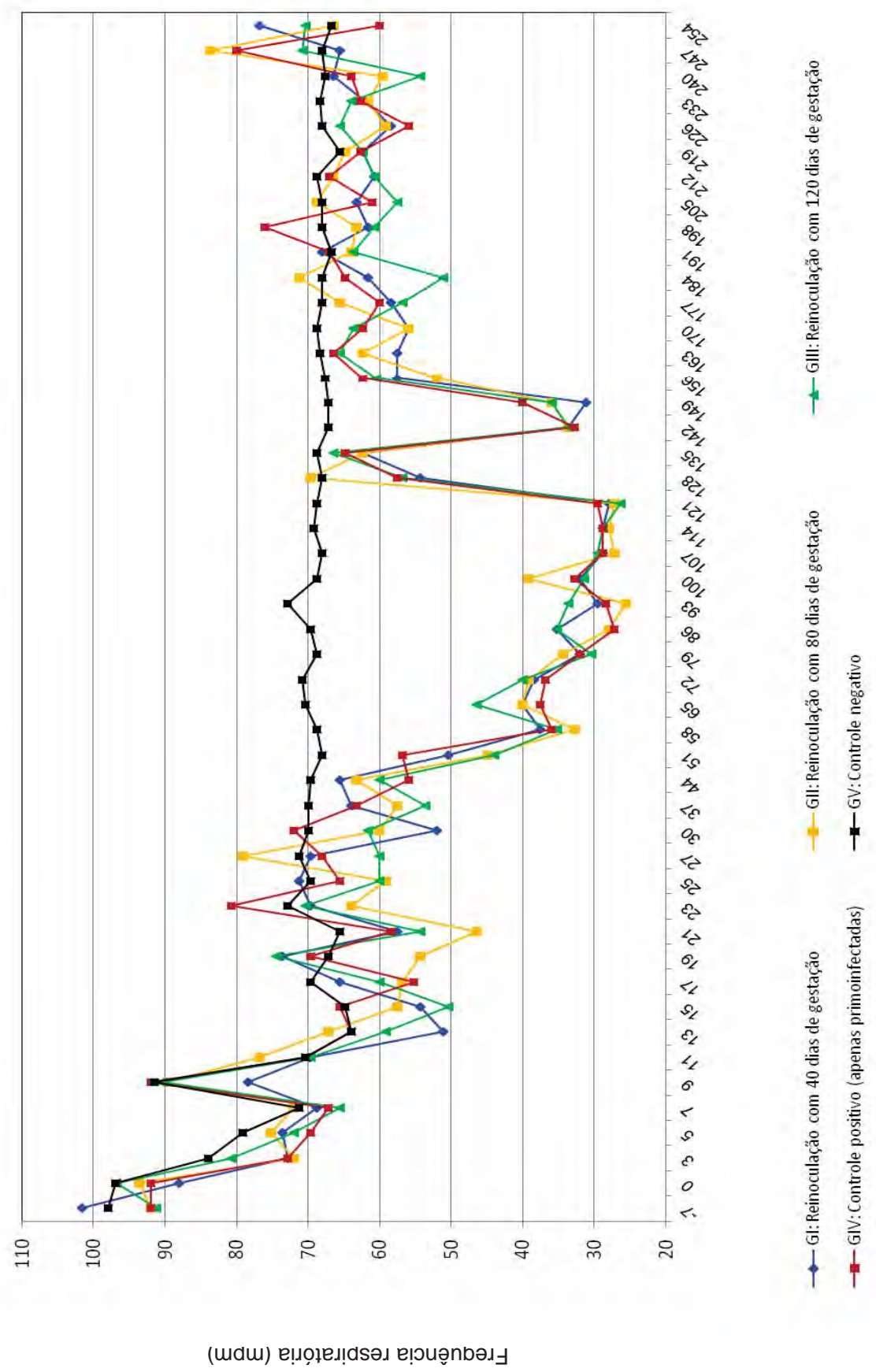


Tabela 4. Temperaturas retais mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

Datas pós-primoinfecção	Grupos Experimentais / Médias e Desvios Padrões										Análise de Variância						
	GI: Reinoculação com 40 dias de gestação		GII: Reinoculação com 80 dias de gestação		GIII: Reinoculação com 120 dias de gestação		GIV: Controle positivo (apenas primoinfectadas)		GV: Controle negativo		Valor de F	Pr > F					
-7	39,74	± 0,15	Aa	39,46	± 0,27	ABa	39,36	± 0,36	ABa	39,50	± 0,27	Aa	38,96	± 0,33	Ba	4,98	0,0060
0	39,48	± 0,15	Aa	39,50	± 0,46	Aa	39,54	± 0,36	Aa	39,42	± 0,34	Aa	39,00	± 0,34	Aa	2,07	0,1235
3	39,50	± 0,25	Aa	39,42	± 0,23	Aa	39,56	± 0,22	Aa	39,44	± 0,15	Aa	38,92	± 0,22	Ba	6,99	0,0011
5	39,40	± 0,16	Aa	39,58	± 0,36	Aa	39,48	± 0,22	Aa	39,52	± 0,29	Aa	39,30	± 0,43	Aa	0,63	0,6464
7	39,90	± 0,56	Aa	39,76	± 0,86	Aa	39,78	± 0,62	Aa	39,56	± 0,71	Aa	39,16	± 0,56	Aa	0,93	0,4651
9	39,22	± 0,13	Aa	39,06	± 0,42	Aa	39,20	± 0,62	Aa	39,20	± 0,40	Aa	39,08	± 0,39	Aa	0,16	0,9555
11	39,32	± 0,20	Aa	39,16	± 0,27	Aa	39,22	± 0,35	Aa	39,56	± 0,36	Aa	39,30	± 0,43	Aa	1,06	0,4020
13	39,22	± 0,08	Aa	39,18	± 0,22	Aa	39,18	± 0,08	Aa	39,40	± 0,16	Aa	39,00	± 0,39	Aa	2,15	0,1123
15	38,80	± 0,35	Aa	39,14	± 0,11	Aa	38,78	± 0,34	Aa	39,16	± 0,40	Aa	38,96	± 0,34	Aa	1,55	0,2274
17	38,84	± 0,27	Aa	38,78	± 0,16	Aa	38,52	± 0,28	Aa	38,72	± 0,27	Abcd	39,08	± 0,49	Aa	2,12	0,1167
19	39,58	± 0,29	Aa	39,34	± 0,36	ABa	39,00	± 0,19	Ba	39,18	± 0,16	ABa	39,18	± 0,26	ABa	3,39	0,0286
21	39,18	± 0,31	Aa	39,32	± 0,36	Aa	39,24	± 0,72	Aa	39,22	± 0,30	Aa	38,90	± 0,66	Aa	0,51	0,7285
23	38,64	± 0,29	Ba	38,50	± 0,10	Ba	38,52	± 0,22	Ba	38,40	± 0,19	Bde	39,26	± 0,43	Aa	8,15	0,0005
25	38,80	± 0,22	Aa	38,68	± 0,29	Aa	38,70	± 0,19	Aa	38,56	± 0,29	Acde	39,04	± 0,42	Aa	1,92	0,1465
27	39,00	± 0,22	Aa	38,90	± 0,43	Aa	39,10	± 0,63	Aa	38,68	± 0,29	Abcd	39,08	± 0,33	Aa	0,88	0,4912
30	38,96	± 0,21	Aa	38,86	± 0,32	Aa	39,14	± 0,43	Aa	38,88	± 0,19	Aab	39,00	± 0,10	Aa	0,83	0,5204
37	39,02	± 0,16	Aa	38,96	± 0,34	Aa	39,02	± 0,11	Aa	38,96	± 0,13	Aab	39,28	± 0,26	Aa	1,83	0,1625
44	39,00	± 0,32	Aa	38,84	± 0,21	Aa	38,80	± 0,30	Aa	38,82	± 0,18	Aabc	39,04	± 0,57	Aa	0,52	0,7232
51	39,00	± 0,33	Aa	38,86	± 0,21	Aa	38,94	± 0,22	Aa	38,90	± 0,10	Aab	38,90	± 0,42	Aa	0,18	0,9454
58	39,26	± 0,17	Aa	38,88	± 0,27	Aa	38,80	± 0,25	Aa	39,10	± 0,23	Aa	39,20	± 0,49	Aa	2,16	0,1112
65	39,16	± 0,30	Aa	39,46	± 0,34	Aa	39,10	± 0,38	Aa	39,10	± 0,34	Aa	38,98	± 0,40	Aa	1,29	0,3074
72	38,86	± 0,60	Aa	39,26	± 0,43	Aa	39,02	± 0,29	Aa	38,84	± 0,32	Aabc	38,90	± 0,29	Aa	0,92	0,4739
79	38,90	± 0,31	Aa	38,86	± 0,49	Aa	39,08	± 0,24	Aa	39,00	± 0,40	Aab	38,86	± 0,23	Aa	0,39	0,8157
86	38,94	± 0,24	Aa	38,88	± 0,18	Aa	38,96	± 0,15	Aa	38,90	± 0,31	Aab	38,94	± 0,23	Aa	0,10	0,9800
93	38,50	± 0,43	Aa	38,34	± 0,36	Aa	38,60	± 0,43	Aa	38,32	± 0,40	Aef	39,02	± 0,26	Aa	2,77	0,0553
100	38,48	± 0,36	Aa	38,78	± 0,23	Aa	38,56	± 0,30	Aa	38,46	± 0,40	Ade	39,04	± 0,44	Aa	2,42	0,0824
107	37,78	± 0,32	Ba	37,60	± 0,16	Ba	37,82	± 0,13	Ba	37,76	± 0,17	Bg	39,00	± 0,43	Aa	22,73	0,0000
114	38,36	± 0,35	Ba	38,40	± 0,42	Ba	38,26	± 0,42	Ba	37,94	± 0,18	Bfg	39,18	± 0,43	Aa	7,52	0,0007
121	37,72	± 0,26	Aa	37,58	± 0,24	Aa	37,76	± 0,34	Aa	37,88	± 0,28	Ag	37,94	± 0,27	Aa	1,28	0,3094
128	38,32	± 0,31	ABa	38,12	± 0,13	Ba	38,48	± 0,34	Ba	38,36	± 0,29	Bde	38,90	± 0,58	Aa	3,24	0,0334
135	38,68	± 0,33	Aa	39,16	± 0,13	Aa	38,80	± 0,28	Aa	38,82	± 0,16	Aabc	39,16	± 0,40	Aa	3,12	0,0880
142	39,04	± 0,21	Aa	39,10	± 0,12	Aa	38,90	± 0,20	Aa	39,04	± 0,11	Aa	39,22	± 0,19	Aa	2,26	0,0983
149	39,26	± 0,34	Aa	39,28	± 0,26	Aa	39,14	± 0,18	Aa	39,08	± 0,18	Aa	39,51	± 0,22	Aa	2,30	0,0946
156	38,86	± 0,15	Ba	38,70	± 0,29	Ba	38,90	± 0,22	Ba	38,80	± 0,16	Babc	39,46	± 0,22	Aa	9,62	0,0002
163	38,50	± 0,32	Ba	38,24	± 0,17	Ba	38,26	± 0,28	Ba	38,52	± 0,34	Bcde	39,52	± 0,36	Aa	15,22	0,0000
170	38,82	± 0,22	Aa	38,80	± 0,20	Aa	38,94	± 0,09	Aa	38,82	± 0,19	Aabc	38,74	± 0,27	Aa	0,64	0,6375
177	39,34	± 0,15	Aa	39,20	± 0,25	Aa	39,12	± 0,22	Aa	39,14	± 0,18	Aa	39,04	± 0,30	Aa	1,20	0,3419
184	39,08	± 0,13	ABa	39,00	± 0,16	ABa	38,88	± 0,13	ABa	38,62	± 0,33	Bbode	39,38	± 0,43	Aa	5,40	0,0041
191	38,84	± 0,13	Aa	38,96	± 0,29	Aa	38,78	± 0,18	Aa	38,78	± 0,39	Aabcd	38,94	± 0,50	Aa	0,35	0,8416
198	38,86	± 0,13	Aa	38,86	± 0,30	Aa	39,02	± 0,08	Aa	38,75	± 0,19	Abcd	39,12	± 0,23	Aa	2,40	0,0858
205	39,02	± 0,19	Aa	38,92	± 0,33	Aa	39,02	± 0,22	Aa	38,98	± 0,05	Aab	38,90	± 0,33	Aa	0,24	0,9107
212	39,14	± 0,31	Aa	39,10	± 0,39	Aa	39,06	± 0,34	Aa	39,05	± 0,33	Aa	38,98	± 0,41	Aa	0,14	0,9672
219	38,22	± 0,18	ABa	38,90	± 0,12	ABa	38,50	± 0,44	ABa	37,90	± 0,36	Bg	39,26	± 0,41	Aa	11,65	0,0001
226	39,68	± 0,29	Aa	39,78	± 0,19	Aa	39,56	± 0,49	ABa	39,00	± 0,10	ABab	38,92	± 0,38	Ba	6,27	0,0024
233	38,44	± 0,18	Ba	38,40	± 0,29	Ba	38,58	± 0,16	ABa	38,37	± 0,21	Be	38,98	± 0,40	Aa	4,15	0,0148
240	38,96	± 0,23	Aa	39,22	± 0,33	Aa	39,18	± 0,29	Aa	38,77	± 0,06	Abcd	38,78	± 0,34	Aa	2,55	0,0749
247	38,96	± 0,13	Aa	39,26	± 0,24	Ba	39,36	± 0,36	Aa	38,90	± 0,00	Aab	38,88	± 0,28	Aa	3,63	0,0745
254	39,02	± 0,28	Aa	39,38	± 0,34	Aa	39,06	± 0,19	Aa	39,07	± 0,15	Aa	39,12	± 0,43	Aa	1,08	0,3946
Valor de F	0,05			0,06			1,26			5,31			0,02				
Pr > F	1,0000			1,0000			0,1187			<0,0001			1,0000				

*: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t (p>0,05)

Figura 9. “Box plot” das temperaturas retais mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectadas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

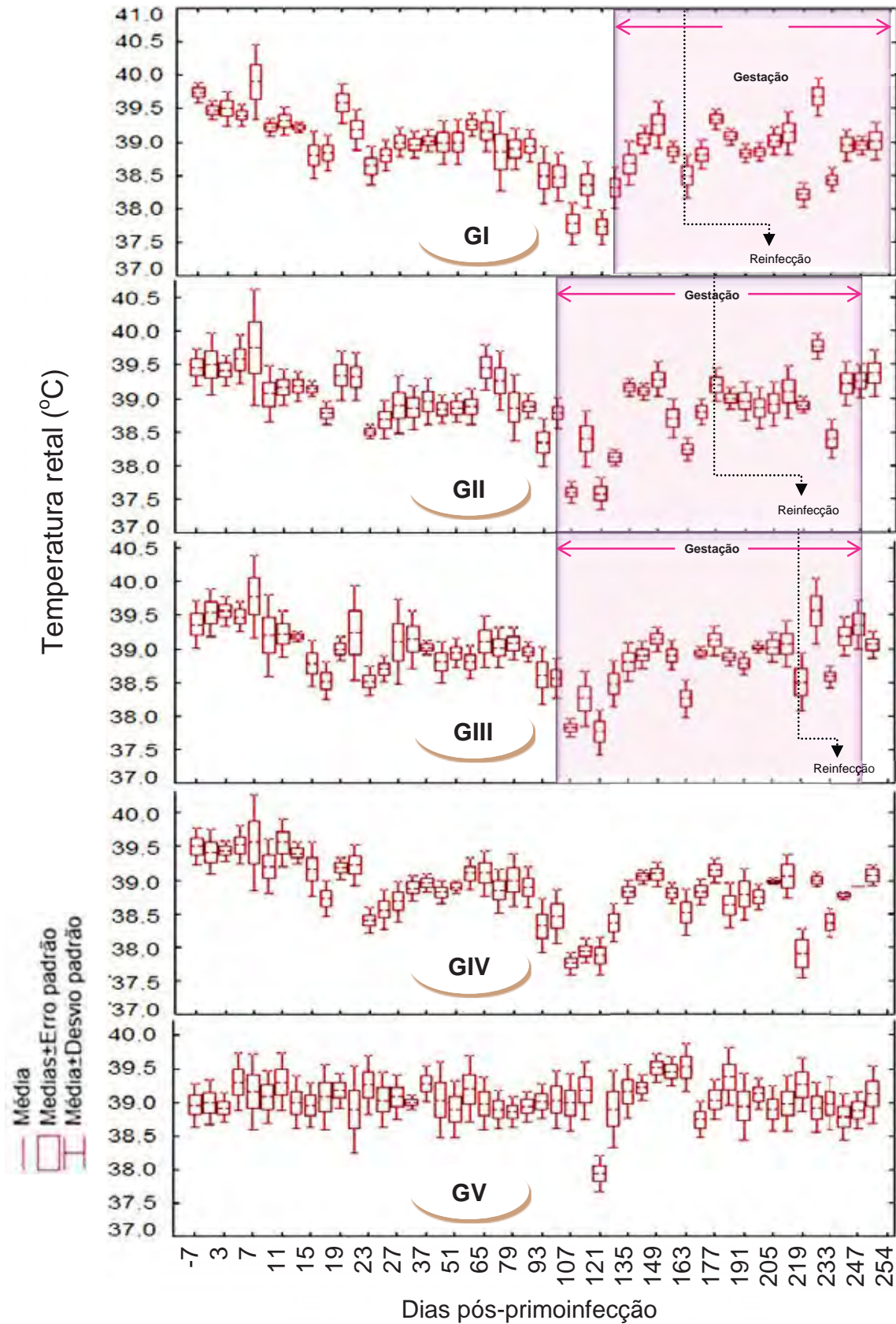
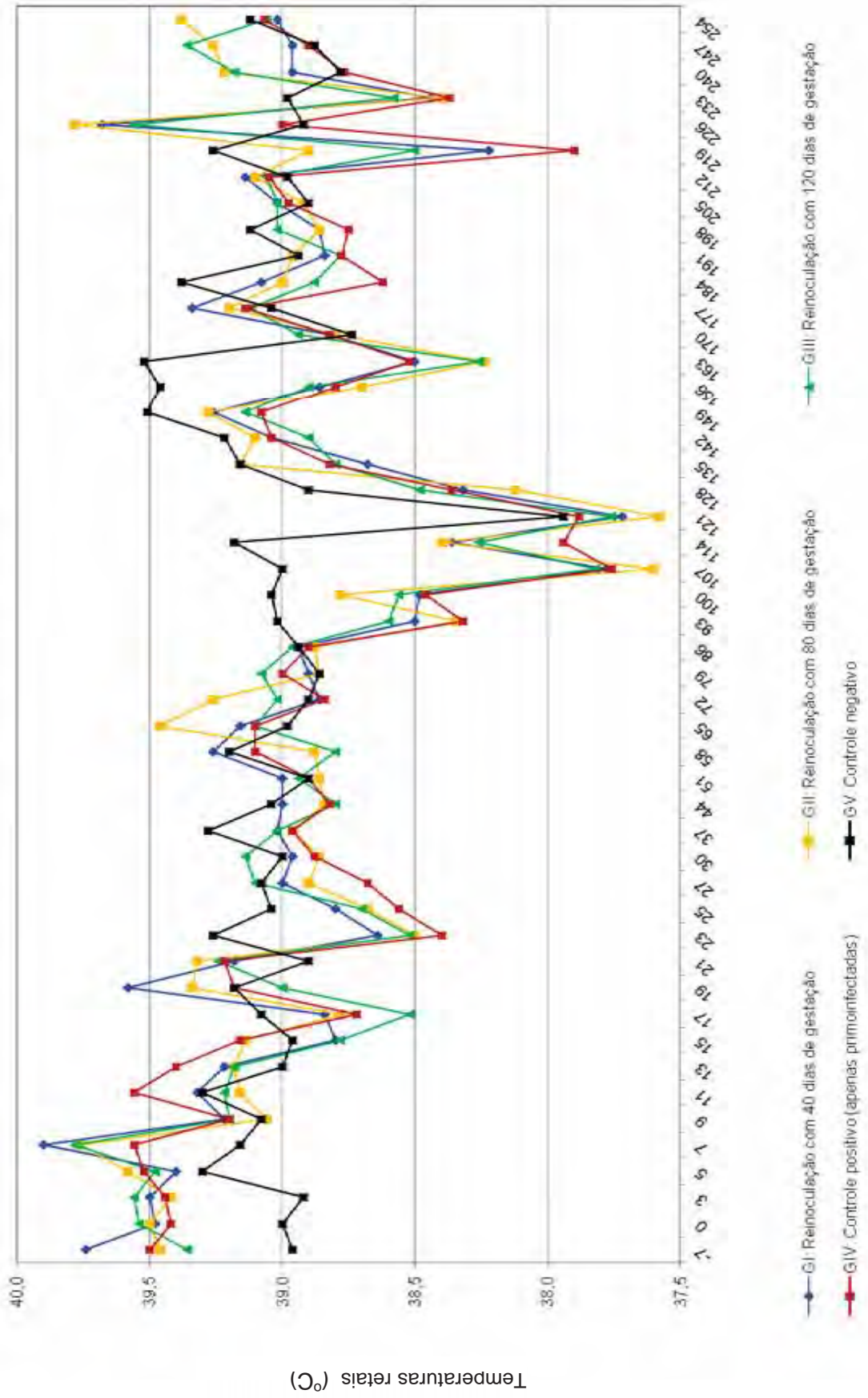


Figura 8. Temperaturas retais mensuradas em ovelhas primoinfectadas, reinfectedas e não infectadas (controle negativo). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.



Temperaturas retais (°C)

Baseando-se na variação das frequências cardíacas, frequências respiratórias e temperatura corporal, mínima e máxima, obtidas das ovelhas do grupo controle negativo, estabeleceram-se como parâmetros de normalidades para este estudo os seguintes valores, 86 a 116 bpm, 56 a 112 mpm e 37,5° a 40°C, respectivamente.

Sinais clínicos pós-primoinfecção como hipertermia, apatia, anorexia e fezes amolecidas, foram observados entre o 5º e 7º DPP. Após a reinfecção (oocistos da cepa VEG - tipo III) das ovelhas primoinfectadas não foi possível diagnosticar, qualquer alteração nas frequências cardíacas e respiratórias e temperatura retal que pudesse ser atribuída à infecção toxoplásmica. Verificou-se, ainda, que elevados valores de frequência respiratória e temperatura registrados para algumas ovelhas dos três grupos experimentais, coincidiram com o terço final da gestação de cada animal (Tabela 5, Figura 7 e 8).

4.5 Exames ultrassonográficos

As ovelhas experimentais foram avaliadas, por meio de ultrassonografia, para a confirmação de gestação. Primeiramente, este exame confirmou o diagnóstico de gestação (41 dias) em 10 ovelhas. Estas ovelhas experimentais constituíram os grupos inoculados com 80 e 120 dias de gestação. Após 21 dias, o exame ultrassonográfico confirmou a gestação (aproximadamente 39 dias) nas demais ovelhas experimentais. Estas compuseram os grupos controle e reinfestado com 40 dias de gestação.

Após as reinfecções, os animais foram submetidos à ultrassonografia quinzenal, via transabdominal, para avaliar a evolução da gestação, bem como para detectar eventuais alterações ou perdas fetais que pudessem passar despercebidas às observações clínicas.

Por meio dos exames ultrassonográficos não foi possível diagnosticar nenhuma alteração nos cordeiros durante toda a gestação, em todas as ovelhas examinadas.

4.6 Resposta imune-humoral

4.6.1. Ovelhas

Na Tabela 6 estão sintetizados os resultados da pesquisa de anticorpos (IgG) contra *T. gondii* pela RIFI, nos soros de todas as ovelhas experimentais, obtidos de amostras sanguíneas colhidas imediatamente antes da primoinfecção e a cada três dias até o 30º dia após a primoinfecção; e semanalmente, até o fim da gestação (CAMARGO, 1964).

A soroconversão (RIFI \geq 64) iniciou-se cinco dias após a primoinfecção, sendo que no 11º dia pós-primoinfecção todos os animais, pertencentes aos grupos I, II, III e IV mostravam títulos maiores ou iguais a 64, comprovando a infectividade do inóculo utilizado. As ovelhas mantidas como controle negativo, mantiveram-se sorologicamente negativas para infecção toxoplásmica, ao longo de todo período experimental.

Do 13º ao 79º dias após a primoinfecção foram detectados títulos sorológicos máximos da ordem de 4096. Posteriormente ao 93º dia, os títulos máximos alcançados foram de 512 até a reinfecção experimental. Aproximadamente 20 dias após a reinoculação com $2,5 \times 10^3$ oocistos da cepa VEG de *T. gondii* foram detectados títulos máximos de 2048, em uma ovelha do GI, uma do GII e em três do GIII.

Todas as ovelhas conservaram-se sorologicamente negativas para brucelose, leptospirose e neosporose, durante todo período experimental.

4.6.2. Cordeiros, natimortos e/ou fetos

Para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* nos cordeiros, natimortos e/ou fetos utilizou-se o soro ou fluído pleural. Foram considerados positivos títulos superiores a 32 (BUXTON et al., 2006). Os cordeiros saudáveis também foram avaliados sendo realizadas colheitas sanguíneas imediatamente após o nascimento (antes da ingestão do colostro) e no 3^o e 14^o (eutanásia) dia de idade (Tabela 7).

Tabela 6. Título de anticorpos (IgG) obtidos pela reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em cordeiros, natimortos e/ou fetos, provenientes de ovelhas primoinfectadas (cepa ME49) e reinfectedadas com $2,5 \times 10^3$ oocistos (cepa VEG) de *Toxoplasma gondii* e ovelhas apenas primoinfectadas (cepa ME49).

Grupo	Número da ovelha / Respectivo cordeiro	Título de anticorpos contra <i>T. gondii</i> (RIFI)/ Dias após o nascimento		
		Imediatamente após o nascimento (pré-colostral)	3	14
GI: Reinoculação com 40 dias de gestação	958 Cordeiro	32	32	32
	970 Cordeiro	32	NR	NR
	Feto	32	NR	NR
	979 Cordeiro	32	32	32
	1039 Cordeiro	32	32	NR
1048 Cordeiro	32	32	NR	
GII: Reinoculação com 80 dias de gestação	972 Cordeiro	32	32	32
	974 Cordeiro	32	32	32
	975 Cordeiro 1	-	32	NR
	Cordeiro 2	32	NR	NR
	980 Cordeiro 1	-	32	32
Cordeiro 2	32	32	32	
1016 Natimorto	32	NR	NR	
GIII: Reinoculação com 120 dias de gestação	1019 Cordeiro	32	NR	NR
	1027 Cordeiro	32	NR	NR
	Feto	32	NR	NR
	1038 Cordeiro	32	32	32
	1041 Cordeiro	32	NR	NR
Natimorto	32	NR	NR	
1049 Cordeiro	32	NR	NR	
Natimorto	32	NR	NR	
GIV: Controle positivo	Feto 1	-	NR	NR
	Feto 2	32	NR	NR
	1017 Feto 3	32	NR	NR
	Feto 4	32	NR	NR
	Feto 5	-	NR	NR
	1044 Cordeiro 1	32	NR	NR
	Natimorto	32	NR	NR
1046 Cordeiro	-	32	32	
1023 Cordeiro	-	32	32	

-: negativo (RIFI<32)

NR: não realizado

Analisando a Tabela 7, verifica-se que dos 30 cordeiros, das fêmeas pertencentes aos GI, GII, GIII e GIV, 24 apresentaram títulos de anticorpos contra este coccídio, logo ao nascimento. Esta primeira colheita de sangue foi realizada antes que os cordeiros ingerissem o colostro. Tal fato comprova que o contato que estes animais tiveram com *T. gondii*, ocorreu durante a gestação. Os anticorpos, em nove cordeiros, mantiveram-se presentes até o 14º dia de vida, quando os mesmos foram eutanasiados para posterior pesquisa de *T. gondii* por meio de outras técnicas.

4.6.3. Carneiros

Os três carneiros (10, 23, 50) mantiveram-se sorologicamente negativos para toxoplasmose, brucelose, leptospirose e neosporose, durante todo o experimento (65 a 184 dias pós-primoinfecção).

4.7 Ocorrências clínicas

As 20 ovelhas gestantes, pertencentes aos grupos I, II, III e IV, conceberam 25 cordeiros, sendo seis do GI, sete do GII, oito do GIII e quatro do GIV.

Das cinco ovelhas do grupo I, quatro ovelhas (958, 979, 1039 e 1048) conceberam, cada uma, um cordeiro sadio e a outra ovelha (970) gerou um cordeiro, que veio a óbito quatro horas após o nascimento. À necropsia verificou-se no útero desta ovelha a presença de um feto (Prancha 1).



Prancha 1. (1) Cordeiro da ovelha 958. (2) Feto da Ovelha 970. (3) Cordeiro da ovelha 979. (4) Cordeiro da Ovelha 1039. (5) Cordeiro da ovelha 1048. (6) Cordeiro da ovelha 1048.

As ovelhas do GII produziram sete cordeiros, sendo quatro saudáveis (974, 975, 980), um com malformação congênita nos membros anteriores e posteriores (972), um que veio a óbito 48 horas após o nascimento (975) e outro natimorto (1016) (Prancha 2).



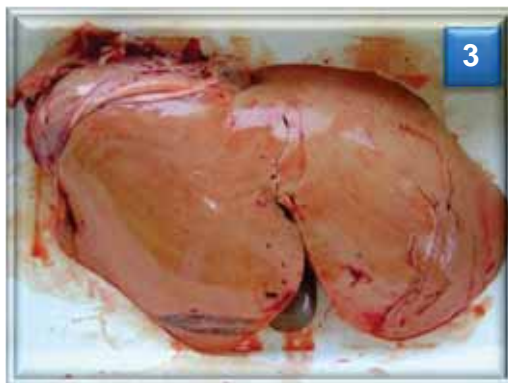
Prancha 2. (1) Cordeiro da ovelha 972. (2) Cordeiro da ovelha 974. (3) Cordeiros da ovelha 975. (4) Cordeiro 1 da ovelha 975. (5 e 6) Cordeiros da ovelha 980.

Oito cordeiros foram gerados pelas ovelhas pertencentes ao grupo III (Prancha 3), destes um era saudável (1038), dois apresentavam alterações nas quatro patas (1019 e 1049), dois vieram a óbito três horas após o nascimento (1027 e 1041), um feto macerado (1027) e dois natimortos (1041 e 1049).



Prancha 3. (1) Cordeiro da ovelha 1019. (2) Cordeiro da ovelha 1027. (3) Feto macerado da ovelha 1027. (4) Cordeiro da ovelha 1038. (5) Natimorto da ovelha 1049. (6) Cordeiro da ovelha 1049.

As ovelhas do grupo IV (Prancha 4) produziram quatro cordeiros, sendo dois saudáveis (1046 e 1023), um que veio a óbito duas horas após o nascimento (1044) e um natimorto (1044). A ovelha 1017 veio a óbito com, aproximadamente, 123 dias de gestação. Esta ovelha apresentava cinco fetos em seu útero.



Prancha 4. (1) Natimorto da ovelha 1044. (2) Fetos da ovelha 1017. (3) Fígado da ovelha 1017. (4) Útero da ovelha 1017. (5) Ovário esquerdo da ovelha 1017. (6) Ovário direito da ovelha 1017.

4.8 Pesquisa de *T. gondii* nos tecidos das ovelhas e em seus respectivos cordeiros pelo bioensaio em camundongos

Foi possível detectar parasitismo tissular por *T. gondii* (presença de diversos cistos cerebrais contendo bradizoítos), em camundongos inoculados com macerado da placenta, ovário, útero e “pool” de tecidos (musculatura esquelética e cardíaca, cérebro/cerebelo, medula, retina, baço, fígado, rins, pulmão, língua e glândula mamária) provenientes das 20 ovelhas pertencentes aos grupos I, II, III e IV (Tabela 9).

T. gondii, também, estava presente em camundongos inoculados com o “pool” de tecidos (musculatura esquelética e cardíaca, cérebro/cerebelo, medula, retina, baço, fígado, rins, pulmão e língua) oriundos dos cordeiros das respectivas fêmeas (Figura 9).

Nas ovelhas do grupo V (controle negativo) não foi observada a presença de cistos teciduais no macerado do cérebro de *T. gondii* (Tabela 9) e todos os resultados da RIFI foram negativos.

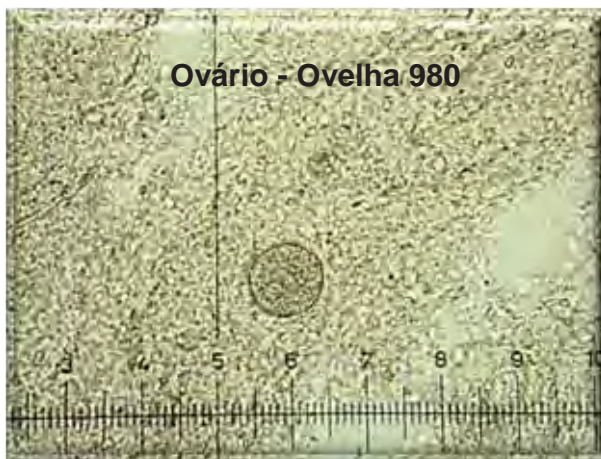
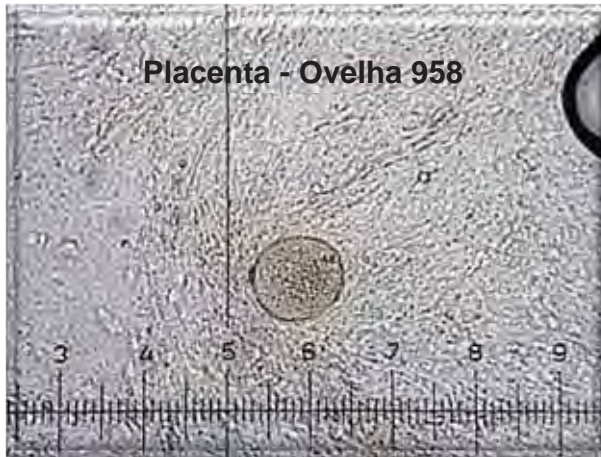
Todos os tecidos avaliados tanto nas ovelhas quanto nos respectivos cordeiros, pertencentes aos grupos I, II, III e IV mostraram-se positivos pela RIFI (título \geq 64).

Tabela 7. Resultados obtidos pela bioprova em camundongos inoculados com fragmentos teciduais obtidos das ovelhas e de seus respectivos cordeiros, natimortos e/ou fetos, pertencentes aos grupos I, II, III, IV e V.

Grupo	Número da ovelha	Fragmentos tissulares / Bioprova				
		Placenta	Ovário	Útero	“Pool” de tecidos	
GI: Reinfecção com 40 dias de gestação	958	Ovelha	1	0	1	0
		Cordeiro	-	-	-	1
	970	Ovelha	1	1	1	1
		Cordeiro	-	-	-	0
	979	Feto	-	-	-	1
		Ovelha	1	1	1	1
	1039	Cordeiro	-	-	-	0
		Ovelha	1	1	1	1
	1048	Cordeiro	-	-	-	0
		Ovelha	1	0	1	1
	Cordeiro	-	-	-	1	
	GII: Reinfecção com 80 dias de gestação	972	Ovelha	0	1	1
Cordeiro			-	-	-	1
974		Ovelha	1	1	0	1
		Cordeiro	-	-	-	1
975		Ovelha	1	1	0	0
		Cordeiro 1	-	-	-	1
		Cordeiro 2	-	-	-	1
		980	Ovelha	1	1	1
Cordeiro 1			-	-	-	1
		Cordeiro 2	-	-	-	1
	1016	Ovelha	1	0	1	1
Natimorto		-	-	-	1	
GIII: Reinfecção com 120 dias de gestação	1019	Ovelha	1	1	0	1
		Cordeiro	-	-	-	1
	1027	Ovelha	1	1	1	1
		Cordeiro	-	-	-	1
		Feto	-	-	-	1
		1038	Ovelha	0	1	1
	Cordeiro		-	-	-	1
	1041	Ovelha	1	0	1	1
		Cordeiro	-	-	-	1
		Natimorto	-	-	-	1
1049		Ovelha	1	1	1	1
	Cordeiro	-	-	-	1	
	Natimorto	-	-	-	0	
	GIV: Controle positivo	1017	Ovelha	1	1	1
Feto 1			-	-	-	1
Feto 2			-	-	-	1
Feto 3			-	-	-	1
Feto 4			-	-	-	1
1044		Feto 5	-	-	-	1
		Ovelha	1	1	1	1
		Cordeiro 1	-	-	-	1
		Natimorto	-	-	-	1
		1046	Ovelha	1	0	0
Cordeiro	-		-	-	1	
1023	Ovelha	1	1	1	1	
	Cordeiro	-	-	-	1	
GV: Controle negativo	903	ovelha	-	0	0	0
	922	ovelha	-	0	0	0
	956	ovelha	-	0	0	0
	944	ovelha	-	0	0	0
	1051	ovelha	-	0	0	0

0: negativo
1: positivo
-: não realizado

Figura 11. Cistos de *T. gondii* identificados no cérebro de camundongos inoculados com macerado de placenta, ovário, útero e “pool” de tecidos obtidos das ovelhas e de seus respectivos cordeiros, natimortos e/ou fetos, pertencentes aos grupos I, II, III e IV. Obj. 20x.



4.9 Detecção do DNA de *T. gondii* pela PCR

A Tabela 10 mostra a presença/ausência do DNA de *T. gondii* na placenta, ovário, útero, glândula mamária, musculatura esquelética e cardíaca, SNC, pulmão, retina, língua, rins, fígado, baço, colostro e “pool” de tecidos de cada ovelha reinfectada em diferentes fases gestacionais (GI, GII e GIII) e de seus respectivos cordeiros. Os resultados da PCR obtidos no grupo das ovelhas apenas primoinfectadas (cepa ME49) – GIV e no controle negativo – GV estão sintetizados na Tabela 11.

Por meio desta técnica foi possível diagnosticar a presença do DNA do *T. gondii* em três, um, quatro, quatro e zero ovelhas dos grupos I, II, III, IV e V, respectivamente (Tabela 10 e 11). Quanto à presença do DNA de *T. gondii* nos cordeiros, natimortos e/ou fetos, foi possível visualizar a amplificação do DNA de 194 pares de base, deste coccídio, em quatro, seis, quatro e oito, provenientes das ovelhas dos grupos I, II, III e IV.

Analisando a Tabela 10 pode-se inferir que os órgãos mais comumente acometidos pelo *T. gondii*, foram: SNC (16), musculatura cardíaca (11), musculatura esquelética (7), ovário (5), glândula mamária (5), fígado (5), língua (5), útero (4), baço (4), rim (4), pulmão (3), placenta (3) e retina (1). Em apenas uma amostra de colostro foi detectada a presença do *T. gondii*. No “pool” de tecidos de cada ovelha e de seus respectivos cordeiros a presença do DNA de *T. gondii* foi revelada em 18 amostras.

Considerando todos os órgãos pesquisados, *T. gondii* foi mais frequente no sistema nervoso central (encéfalo e medula) das ovelhas experimentais e seus respectivos cordeiros.

Tabela 10. Resultados obtidos pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), em fragmentos tissulares colhidos de ovelhas primoinfectadas (cepas 2,5x103 oocistos) e reinfetadas com 2,5x103 oocistos (Cepa VEG) de *Toxoplasma gondii* e de seus respectivos cordeiros.

Grupo	Número da ovelha	Fragmentos tissulares / PCR										Colostro	Pool						
		Placenta	Ovário	Útero	Glândula mamária	Músculo esquelético	Músculo cardíaco	SNC	Pulmão	Retina	Língua			Rim	Fígado	Baço			
GI: Reinfecção com 40 dias de gestação	958	Ovelha	NR	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	0
		Cordeiro	-	-	-	-	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1
		Ovelha	0	0	0	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	NR
	970	Cordeiro	-	-	-	-	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1
		Feto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	979	Ovelha	NR	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	0
		Cordeiro	-	-	-	-	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	-	1
	1039	Ovelha	NR	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
		Cordeiro	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
	1048	Ovelha	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
	Cordeiro	-	-	-	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR	
	TOTAL	0	1	3	2	2	2	3	5	1	1	2	1	2	2	2	0	3	
GI: Reinfecção com 80 dias de gestação	972	Ovelha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	NR
		Cordeiro	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1
	974	Ovelha	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	NR
		Cordeiro	-	-	-	-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1
		Ovelha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	975	Cordeiro 1	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
		Cordeiro 2	-	-	-	-	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	-	1
		Ovelha	NR	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	980	Cordeiro 1	-	-	-	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
		Cordeiro 2	-	-	-	-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
1016	Ovelha	0	0	NR	0	0	0	0	0	0	NR	0	0	0	NR	0	0	NR	
	Natimorto	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
	TOTAL	0	0	1	1	1	4	4	0	0	2	1	1	1	1	1	1	4	
GI: Reinfecção com 120 dias de gestação	1019	Ovelha	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	NR
		Cordeiro	-	-	-	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
		Ovelha	NR	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
	1027	Cordeiro	-	-	-	-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1
		Feto	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0
	1038	Ovelha	NR	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
		Cordeiro	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	NR
		Ovelha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	
	1041	Cordeiro	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	0
		Natimorto	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	0
1049	Cordeiro	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NR	1	
	Natimorto	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	1	
	TOTAL	1	2	0	1	1	2	4	1	0	0	2	2	2	2	2	1	0	

0: negativo

1: positivo

NR: não realizado

Tabela 11. Resultados obtidos pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), em fragmentos tissulares colhidos de ovelhas apenas primoinfectadas (cepa ME49) e de ovelhas pertencentes ao grupo controle negativo (não infectado) e de seus respectivos cordeiros.

Grupo	Número da ovelha	Fragmentos tissulares / PCR										Pool					
		Placenta	Ovário	Útero	Glândula mamária	Músculo esquelético	Músculo cardíaco	SNC	Pulmão	Retina	Língua	Rim	Fígado	Baço	Colostro		
GIV: Controle positivo	Ovelha	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	NR	1
	Feto 1	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
	Feto 2	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
	Feto 3	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
	Feto 4	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
	Feto 5	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
	Ovelha	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	NR	1
	Cordeiro 1	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	Natimorto	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	Ovelha	NR	0	0	NR	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NR	NR
Cordeiro	-	-	-	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	1	
Ovelha	1	NR	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	NR	
Cordeiro	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR	
TOTAL	2	2	0	1	3	2	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	8
GV: Controle negativo	ovelha	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
	ovelha	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
	ovelha	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
	ovelha	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
	ovelha	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR
ovelha	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	NR	
TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	3	5	4	5	7	11	16	3	1	5	4	5	4	4	1	18	

0: ausência

1: presença

NR: não realizado

4.10 Achados histopatológicos

Nos exames histopatológicos realizados nos fragmentos de órgãos colhidos durante a necropsia das ovelhas pertencentes ao grupo controle negativo (903, 922, 956, 944 e 1051), nenhuma lesão digna de nota foi demonstrada. As alterações observadas nas ovelhas reinfectedas e seus respectivos cordeiros estão descritas a seguir.

✓ Ovelha 958

- **Ovelha**

- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.

- **Cordeiro**

- Fígado: degeneração hidrópica moderada centrolobular e degeneração gordurosa discreta difusa.

✓ Ovelha 970

- **Ovelha**

- Pulmão: Espessamento de septos com discreto edema multifocal. Infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar multifocal discreto.
- Fígado: degeneração hidrópica discreta difusa. Degeneração gordurosa moderada difusa. Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal discreto periportal e no parênquima, com necrose.
- Rins: cilindros hialinos na luz dos túbulos.
- Língua: presença de cisto tecidual.
- Glândula mamária: nenhuma alteração digna de nota.

- **Cordeiro**

- Fígado: degeneração hidrópica moderada centrolobular e degeneração gordurosa discreta difusa.

- **Feto**
 - Fígado: degeneração hidrópica moderada difusa. Degeneração gordurosa moderada difusa. Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal discreto. Desarranjo dos cordões de hepatócitos. Congestão intensa.

- ✓ **Ovelha 979**
 - **Ovelha**
 - Pulmão: espessamento dos septos, com infiltrado inflamatório misto discreto difuso e infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar discreto.
 - Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa e degeneração gordurosa discreta difusa.
 - Baço: presença de grandes quantidades de hemosiderina.
 - Língua: Infiltrado inflamatório misto moderado multifocal na submucosa.
 - **Cordeiro**
 - Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.

- ✓ **Ovelha 1039**
 - **Ovelha**
 - Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
 - **Cordeiro**
 - Fígado: colestase em hepatócitos e ductos, periportal discreta.

- ✓ **Ovelha 1048**
 - **Ovelha**
 - Pulmão: espessamento dos septos com poucas células mistas difusas.
 - Fígado: degeneração hidrópica moderada difusa.
 - Língua: presença de cisto tecidual.
 - **Cordeiro**
 - Fígado: infiltrado misto moderado multifocal com necrose.

✓ **Ovelha 972**

• **Ovelha**

- Pulmão: espessamento dos septos, com infiltrado inflamatório mononuclear multifocal e peribronquiolar.
- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa e degeneração gordurosa discreta difusa.
- Baço: presença de grandes quantidades de hemosiderina.

• **Cordeiro**

- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa e degeneração gordurosa discreta difusa.

✓ **Ovelha 974**

• **Ovelha**

- Pulmão: hemorragia
- Língua: Infiltrado inflamatório mononuclear discreto difuso na submucosa.

• **Cordeiro**

- Fígado: degeneração hidrópica discreta difusa.

✓ **Ovelha 975**

• **Cordeiro 1**

- Fígado: degeneração hidrópica discreta difusa.

• **Cordeiro 2**

- Fígado: degeneração hidrópica moderada difusa e degeneração gordurosa moderada difusa.

✓ **Ovelha 980**

• **Ovelha**

- Pulmão: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal moderado perivascular e peribronquiolar com hemorragia.
- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
- Baço: presença de hemosiderina.

- Língua: Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal moderado na submucosa.

- **Cordeiro 1**

- Pulmão: infiltrado inflamatório misto perivascular e peribronquiolar discreto.
- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
- Rins: edema glomerular discreto multifocal. Infiltrado inflamatório mononuclear focal discreto.

- **Cordeiro 2**

- Fígado: degeneração gordurosa e hidrópica acentuada difusa.

✓ **Ovelha 1016**

- **Ovelha**

- Pulmão: espessamento de septos
- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa e degeneração gordurosa moderada na região centrolobular.
- Baço: presença de hemosiderina.

- **Natimorto**

- Pulmão: Colabado.

✓ **Ovelha 1019**

- **Ovelha**

- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
- Baço: presença de hemosiderina.
- Língua: Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal moderado na submucosa.

- **Cordeiro**

- Pulmão: infiltrado inflamatório misto perivascular e peribronquiolar discreto.
- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
- Rins: edema glomerular discreto multifocal. Infiltrado inflamatório mononuclear focal discreto.

✓ **Ovelha 1027**

• **Ovelha**

- Fígado: degeneração hidrópica moderada difusa. Degeneração gordurosa discreta difusa.

• **Feto**

- Pulmão: Colabado.
- Fígado: colestase intra-hepática discreta difusa.
- Baço: depleção linfoide.

✓ **Ovelha 1038**

• **Ovelha**

- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
- Língua: Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal moderado na submucosa.

• **Cordeiro**

- Pulmão: espessamento de septo.
- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
- Língua: Infiltrado inflamatório misto multifocal discreto na submucosa.

✓ **Ovelha 1041**

• **Ovelha**

- Pulmão: espessamento de septo.
- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa.
- Baço: depleção de folículos linfoides.
- Língua: Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal moderado na submucosa.

• **Cordeiro**

- Baço: depleção linfóide.

• **Natimorto**

- Fígado: degeneração gordurosa moderada difusa.

✓ **Ovelha 1049**• **Ovelha**

- Fígado: degeneração hidrópica moderada difusa.
- Baço: grande quantidade de hemossiderina.
- Língua: Infiltrado inflamatório mononuclear focal moderado.

• **Natimorto**

- Fígado: degeneração hidrópica e gordurosa moderada centrolobular.

✓ **Ovelha 1017**• **Ovelha**

- Fígado: degeneração gordurosa acentuada difusa.
- Baço: grande quantidade de hemossiderina.

• **Feto 1**

- Rins: hemossiderose globular.

• **Feto 3**

- Fígado: degeneração hidrópica e gordurosa moderada centrolobular.

• **Feto 4**

- Fígado: Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal discreto.

✓ **Ovelha 1044**• **Ovelha**

- Pulmão: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal discreto peribronquiolar.
- Fígado: degeneração hidrópica moderada difusa.
- Baço: hiperplasia linfoide.
- Língua: Infiltrado inflamatório mononuclear focal moderado.

• **Cordeiro**

- Pulmão: Colabado.
- Língua: hemorragia acentuada difusa na musculatura.

• **Natimorto**

- Pulmão: Colabado.

- Fígado: degeneração gordurosa acentuada difusa.

✓ **Ovelha 1046**

- **Ovelha**

- Pulmão: extensa área de necrose com infiltrado inflamatório misto, hemorragia na luz de bronquíolos com grande quantidade de células inflamatória (polimorfonucleares).
- Coração: Infiltrado inflamatório mononuclear perivascular discreto no epicárdio
- Fígado: degeneração hidrópica discreta difusa. Degeneração gordurosa moderada difusa. Infiltrado inflamatório mononuclear periportal discreto.

- **Cordeiro**

- Fígado: degeneração hidrópica acentuada difusa. Degeneração gordurosa discreta difusa.

5 DISCUSSÃO

Os exames clínicos (frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, avaliação de linfonodos e condição corporal, entre outros), hematológicos, sorológicos, coproparasitológicos e ultrassonográficos (fêmeas) realizados nos ovinos, comprovam a sanidade dos animais selecionados para esta pesquisa. Vale ressaltar, que todos os ovinos além de não terem tido contato prévio com *T. gondii*, mantiveram-se negativos para neosporose, brucelose e leptospirose durante o período experimental avaliado (12 meses).

Poucos estudos de tipagem genética têm sido realizados em isolados de *T. gondii* em ovelhas. OWEN & TREES (1999) constataram que o DNA amplificado diretamente da placenta de 13 ovelhas abortadas, de 10 fazendas no Reino Unido e dois isolados de corações de cordeiros de um local indefinido eram todos do tipo II, com base no locus SAG2. JUNGENSEN et al. (2002) relataram que 11 isolados de *T. gondii* da Dinamarca (seis de cordeiros abortados e cinco de ovelhas saudáveis) foram também do Tipo II. Os resultados do Reino Unido e Dinamarca são de interesse visto que não houve diferença no genótipo com base no estado de saúde (aborto) dos animais.

DUMÈTRE et al. (2006) observaram que todos os oito isolados de *T. gondii* de ovelhas adultas na França, persistentemente infectadas com este protozoário eram do tipo II, usando o locus SAG2 e cinco marcadores de satélite (TUB2, TgM-A, W35, B17 e B18). Usando os mesmos marcadores como DUMÈTRE et al. (2006), ZIA-ALI et al. (2007) constataram que dos quatro isolados de *T. gondii* de ovinos adultos no Irã, dois isolados foram do tipo II e dois eram do tipo III. DUBEY et al. (2008) encontraram 15 genótipos entre os 57 isolados de *T. gondii* por meio de 10 marcadores PCR-RFLP, sugerindo alta diversidade genética do parasito em cordeiros de Maryland, Virginia e West Virginia (EUA).

A maioria dos genótipos não-clonal tem uma combinação de alelos dos tipos I, II e III a partir de loci diferentes. Não está claro se estes são simplesmente recombinantes a partir de cruzamentos genéticos do tipo clonal I, II e III ou se são linhagens divergentes.

Em síntese, pesquisa recente indica que a linhagem predominante das cepas isoladas de ovelhas era do tipo II. Curiosamente, nenhum isolado tipo I de *T. gondii* foi detectado em ovinos até o momento (DUBEY, 2009).

De acordo com SILVA et al. (2011) confirmaram-se, pela primeira vez no Brasil, a existência de cepa clonal II. Além disso, uma elevada diversidade do parasito, em pequenos ruminantes, também foi comprovada. Esses autores, também, concluíram que cordeiros podem constituir uma importante fonte de transmissão para os seres humanos do *T. gondii* no Brasil.

Pelos resultados citados anteriormente, definiu-se neste experimento realizar um desafio heterólogo, utilizando-se na primoinfecção a cepa ME49 (tipo II) e na reinfecção a cepa VEG (tipo III).

A primoinfecção experimental com oocistos da cepa ME49 (tipo II) de *T. gondii* nas ovelhas utilizadas nesta pesquisa, confirmou-se pela soroconversão. Sinais clínicos como hipertermia, apatia, anorexia e fezes amolecidas, foram observados entre o 5º e 7º DPP. Resultados semelhantes foram obtidos por LOPES (2007), que observou estes sinais clínicos, entre o 5º e 7º DPI, em três ovinos inoculados com oocistos (cepa P) de *T. gondii*.

COLE et al. (1954) utilizando uma amostra de *T. gondii* (cepa não mencionada) isolada de um caso natural, inocularam (via não descrita) 10 ovelhas e três cordeiros. O período de incubação variou de um a seis dias, e os sinais clínicos mais freqüentes em nove ovelhas e nos três cordeiros foram febre, dispnéia e incoordenação motora. Neste caso, a infecção foi fatal em duas ovelhas e em um cordeiro.

GARNHAN & LAINSON (1960) infectaram cordeiros com duas semanas de idade, com aproximadamente 100 cistos de *T. gondii* (cepa não mencionada), pelas vias intraperitoneal (IP), intravenosa (IV) e oral (VO). Sinais clínicos não foram observados, mas de duas semanas até nove meses pós-inoculação, anticorpos contra *T. gondii* foram detectados, utilizando-se a reação de Sabin & Feldman, nos ovinos inoculados.

Após a reinfecção (oocistos da cepa VEG - tipo III) das ovelhas primoinfectadas não foi possível diagnosticar, qualquer alteração nas frequências cardíacas e respiratórias e temperatura retal que pudesse ser atribuída à infecção toxoplásmica.

Verificou-se, ainda, que elevados valores de frequência respiratória e temperatura registrados para algumas ovelhas dos três grupos experimentais, coincidiram com o terço final da gestação de cada animal. Convém salientar que este fato ocorreu devido a mudanças circulatórias características desta fase gestacional, a fatores hormonais ou, ainda, pela pressão do útero contendo os fetos sobre outros órgãos da cavidade abdominal refletindo, assim, diretamente no aumento dos parâmetros clínicos das reprodutoras (SMITH, 1993).

A RIFI é a prova mais utilizada para o diagnóstico da toxoplasmose e considerada como padrão ouro. NETO et al. (2008) recomendam esse método para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii*, em ovinos. Outros autores (MANROPOT & BOTROS 1972; COSTA et al., 1978; SOARES et al., 2009) também utilizam e recomendam esta reação para ruminantes. Títulos de 16 ou maiores eram considerados positivos para *T. gondii* (DUBEY e BEATTIE, 1988). Atualmente consideram-se positivos títulos superiores ou iguais a 64 (COSTA et al., 1977; SOUZA, 2001). UCHÔA et al. (1999) detectaram sensibilidade de 83,8% e especificidade de 79,1% para a RIFI-IgG, em soros humanos.

NETO et al. (2008); SOARES et al. (2009) e PINHEIRO et al. (2009) estabeleceram para ovinos que títulos iguais e/ou acima de 64 são indicativos de contato prévio com *T. gondii*. Considerando este limiar sorológico, para a avaliação de resposta humoral dos ovinos, verifica-se que os animais inoculados com oocistos *T. gondii* responderam rapidamente ao estímulo antigênico, apresentando títulos sorológicos superiores ou iguais a 64 a partir 5º DPI, sendo que no 11º dia pós-primoinfecção todos os animais, pertencentes aos grupos I, II, III e IV mostravam títulos superiores ou iguais a 64, comprovando a infectividade do inóculo utilizado. Esta precocidade na resposta humoral em infecções experimentais de *T. gondii*, foi também detectada por MOURA et al. (2007) em suínos, ARANTES et al. (2009) em cães, LOPES et al. (2009) em ovinos, SCARPELLI et al. (2009) em bovinos e por LOPES (2010) em ovinos.

Título sorológico máximo (4096) foi detectado nas ovelhas primoinfectadas com *T. gondii*, do 13º ao 79º DPP. Posteriormente ao 93º dia, os títulos máximos alcançados foram de 512 até a reinfecção experimental. Estes dados assemelham-se aos

observados por LOPES (2010), que observou decréscimos acentuados dos títulos sorológicos apenas a partir do 63^o e 70^o DPI em ovinos inoculados com oocistos e taquizoítos, respectivamente.

Aproximadamente 20 dias após a reinoculação com $2,5 \times 10^3$ oocistos da cepa VEG de *T. gondii* foram detectados títulos máximos de 2048, em uma ovelha do GI, uma do GII e em três do GIII. Semelhantemente, BRESCIANI (2009) detectou títulos máximos de 4096, em duas cadelas após seis dias da reinfecção com *T. gondii*.

Considerando que as ovelhas do grupo controle negativo mantiveram-se sorologicamente negativas para infecção toxoplásmica, como também, para brucelose, leptospirose e neosporose, durante todo período experimental, pode-se inferir que as desordens reprodutivas verificadas, nas ovelhas inoculadas com *T. gondii* podem ser atribuídas à infecção toxoplásmica.

É importante salientar, que apesar de ter ocorrido decréscimo nos títulos sorológicos nas ovelhas dos grupos experimentais, as mesmas apresentaram, até o parto, anticorpos específicos contra o parasito. Este perfil sorológico foi relatado por SHARMA & SHIMIZU (1974), citados por DUBEY (1986), que descreveram anticorpos relacionados à infecção crônica (IgG) apresentam a capacidade de manterem-se “ativos” por longo período, quando comparados com as imunoglobulinas da classe IgM, notadamente identificadas apenas nas primeiras semanas após infecção.

Verificou-se que dos 30 cordeiros provenientes das fêmeas pertencentes aos grupos I, II, III e IV, 24 apresentaram títulos de anticorpos, contra este coccídio, diagnosticado imediatamente após o nascimento (pré-colostral). Esta primeira colheita de sangue foi realizada antes que os cordeiros ingerissem o colostro, evitando assim ingestão de possíveis anticorpos e taquizoítos presentes no leite das ovelhas. Esta observação comprova que o contato que estes animais tiveram com *T. gondii*, ocorreu durante a gestação.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por LOPES (2010) que evidenciou a presença de anticorpos anti-*T. gondii* (RIFI-IgG), em cinco, dos oito cordeiros de ovelhas naturalmente infectadas por *T. gondii*, logo ao nascimento (pré-colostral).

WILLIAMS et al. (2005) baseando-se exclusivamente em resultados de PCR, relataram que, juntamente com um elevado número de abortamento, uma elevada frequência de transmissão vertical (41 a 69%) deste coccídio ocorreu em cordeiros recém-nascidos. BUXTON et al. (2006) e SILVA & RUE (2006) relataram que a possibilidade de transmissão vertical da toxoplasmose, em ovelhas persistentemente positivas, apesar de ser pequena, não deve ser descartada. FREYRE et al. (2009) avaliando um modelo experimental de transmissão congênita em hamster, constataram que esta via de transmissão ocorreu em 13 dos 17 hamster infectados com oocistos ou bradizoítos de *T. gondii*.

As alterações anatomohistopatológicas, observadas nos ovinos deste experimento, não podem ser atribuídas ao *T. gondii*. Por outro lado, a inexistência de alterações nos tecidos do grupo controle, não permite descartar estes achados. ESTEBAN-REDONDO et al. (1999); SILVA & LANGONI (2001); GARCIA et al. (2006) e LOPES et al. (2011) ressaltaram a dificuldade de diagnosticar este agente etiológico em cortes histológicos.

JACOBS & MOYLE, (1963) isolaram *T. gondii* de 67% dos ovinos sorologicamente positivos, sendo que o diafragma foi o tecido mais parasitado, seguido pela musculatura esquelética e cérebro. WORK (1967), na Dinamarca, realizou tentativas de isolamento de *T. gondii* em diafragma de 30 ovinos, dos quais sete se mostraram positivos. HARTLEY & MOYLE (1974) isolaram *T. gondii* em 14 de 15 cordeiros com infecção congênita. Neste caso, cérebro e musculatura esquelética apresentavam-se positivos para o parasito. Em oito ovinos inoculados com 10.000 oocistos da cepa GT-1, eutanasiados no 97^o e 173^o DPI, DUBEY (1984) verificou a presença de *T. gondii* no coração (sete animais), diafragma, fígado e musculatura esquelética (seis ovinos), além do cérebro (quatro animais).

Os achados histopatológicos do presente estudo são semelhantes aos observados, em cadelas reinfectadas com oocistos e taquizoítos de *T. gondii*, por BRESCIANI et al. (2009).

Por meio da bioprova, isolou-se *T. gondii* (presença de diversos cistos cerebrais contendo bradizoítos), tanto em camundongos inoculados com a placenta, ovário, útero e “pool” de tecidos provenientes das 20 ovelhas pertencentes aos grupos I, II, III e IV,

quanto em camundongos inoculados com “pool” de tecidos dos cordeiros (soropositivos), das respectivas fêmeas reinfectedadas por *T. gondii*. Portanto, há evidencia de que durante a gestação ocorreu a passagem de taquizoítos do coccídio, pela placenta.

Os resultados referidos por SHARMA & GAUTAN (1974); DUBEY & SHARMA (1980) e DUBEY (1984) corroboram com os da presente pesquisa. Os autores anteriormente citados isolaram, pela bioprova, *T. gondii* de órgãos de ovinos após 173 dias de inoculação com oocistos e taquizoítos.

Por meio da técnica da PCR, no presente trabalho, foi possível detectar o DNA do *T. gondii* em 3, 1, 4, 4 e zero ovelhas dos grupos I, II, III, IV e V, respectivamente. Quanto à presença do DNA de *T. gondii* nos cordeiros, natimortos e/ou fetos, foi possível visualizar a amplificação do DNA de 194 pares de base, deste coccídio, em 4, 6, 4 e 8, provenientes das ovelhas dos grupos I, II, III e IV.

Os órgãos mais comumente parasitados pelo *T. gondii*, foram: SNC (16), musculatura cardíaca (11), musculatura esquelética (7), ovário (5), glândula mamária (5), fígado (5), língua (5), útero (4), baço (4), rim (4), pulmão (3), placenta (3) e retina (1). Em uma das amostra de colostro foi detectada a presença do *T. gondii*. No “pool” de tecidos de cada ovelha e de seus respectivos cordeiros a presença do DNA de *T. gondii* foi revelada em 18 amostras. Considerando todos os órgãos pesquisados, *T. gondii* foi mais frequentemente diagnosticado no sistema nervoso central (encéfalo e medula) das ovelhas experimentais e de seus respectivos cordeiros.

Resultados semelhantes foram encontrados por ESTEBAN-REDONDO & INNES (1998), que detectaram o *T. gondii* (isolado M3) com mais freqüência no cérebro e no músculo cardíaco de ovelhas infectadas experimentalmente.

A menor positividade de parasitismo, detectada pela PCR em comparação a bioprova, de algumas amostras genômicas dos ovinos (fêmeas e cordeiros) reinfectedados, não elimina a possibilidade do *T. gondii* estar presente nas mesmas, uma vez que parte destes possa ter sido perdido com a técnica de extração de DNA, além de que o DNA “genômico” (hospedeiro+parasito) por reação, pode conter uma reduzida quantidade de DNA do parasito, que pode ser insuficiente para visualizar a amplificação

de 194 bps no gel de eletroforese 2% corado com brometo de etídeo (DUBEY & THULLIEZ, 1993; ESTEBAN REDONDO et al., 1999 e AQUIZERATE et al 1993).

De acordo com Esteban-Redondo e Innes (1998) na infecção experimental de *T. gondii* em ovelhas, o parasito pôde ser detectado pela PCR de forma mais consistente em um grupo de ovelhas infectadas com 10^5 oocistos quando comparado com um grupo infectado com 10^3 oocistos. Portanto, pode-se inferir que a menor positividade obtida, nesta pesquisa, pela PCR quando comparada ao bioensaio em camundongos, possa estar relacionada a concentração do inóculo utilizada ($2,5 \times 10^3$).

A técnica da PCR pode ser um método vantajoso, quando associado a outro meio de diagnóstico (STEUBER et al., 1995 e ELLIS 1998). Deste modo, os achados da PCR apenas complementam os achados clínicos e da bioprova, e evidenciam que esta técnica pode ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da infecção toxoplásmica. Reforça esta inferência, os resultados obtidos por SILVA & LANGONI (2001), quando estes autores compararam, em ratos, a citologia, histologia, bioensaio e PCR, como meio de diagnóstico para *T. gondii*, concluindo que o bioensaio é significativamente superior as demais técnicas de diagnóstico.

PEREIRA-BUENO et al. (2004) estudando, na Espanha, o abortamento ovino associado ao *T. gondii*, por diferentes técnicas de diagnóstico (histopatológico, RIFI, ELISA e PCR), constataram que a RIFI e ELISA foram os métodos mais sensíveis para detectar este coccídeo, seguidos do exame histológico e da PCR.

A superioridade do bioensaio em camundongos, em comparação à técnica de PCR, também foi constatada em tecidos e/ou sêmen de suínos por GARCIA et al. (2006); TSUTSUI et al. (2007) e MOURA et al. (2007), em cães por ARANTES et al. (2009), em ovinos por LOPES et al. (2009) e LOPES (2010), em gatos por MONTROYA et al. (2009) e em bovinos por SCARPELLI et al. (2009).

VAUGHAN et al. (1996) relataram que problemas reprodutivos em ovelhas, atribuídos ao *T. gondii*, como reabsorção fetal, abortamento, ou natimortalidade, ocorreriam quando há primoinfecção durante a gestação, sendo que a gravidade pode variar de acordo com o estágio da mesma e a cepa de *T. gondii* envolvida. Estes autores afirmaram, ainda, que se a infecção pelo protozoário supracitado acontecer até o septuagésimo dia de gestação, poderá ocorrer à reabsorção fetal ou abortamento.

Assim, quanto mais tarde se der a infecção, maior será a probabilidade do feto nascer viável e sobreviver, podendo estar infectado ou não.

Em pequenos ruminantes, a toxoplasmose é relativamente comum (MAINAR et al., 1996), sendo responsável por problemas reprodutivos, gerando grandes perdas econômicas em rebanhos de ovinos (WYSS et al., 2000; O'ROUKE, 2002; PEREIRA-BUENO et al., 2004), onde a infecção pode tornar-se a principal causa de abortamentos, malformações fetais, nascimento de animais prematuros e mortes neonatais (MALIK et al., 1990). A principal via de infecção é a ingestão de oocistos esporulados do parasito (DUBEY & BEVERLEY, 1988).

Infecções adquiridas no início da gestação (antes dos 50 dias), antes do feto desenvolver a capacidade de produzir anticorpos, normalmente ocasionam morte embrionária e reabsorção (HARTLEY, 1961).

Se a ovelha infectar-se com *T. gondii* no meio da gestação (70-90 dias) haverá uma considerável probabilidade de aborto ou de natimortos (BEVERLEY e WATSON, 1971; WATSON e BEVERLEY, 1971; MILLER et al., 1982).

De acordo com WATSON e BEVERLEY (1971); BLEWETT et al. (1982) e MILLER et al. (1982) se a infecção ocorrer no final da gestação (>110 dias) as ovelhas irão parir normalmente, embora seus cordeiros possam estar infectados congenitamente.

DUNCANSON et al. (2001) relataram que poucas pesquisas têm descrito a ocorrência de cordeiros neonatos saudáveis, porém infectados pelo *T. gondii*, em populações de ovelhas, dados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Das cinco ovelhas pertencentes ao grupo I (reinfectedas com 40 dias de gestação), quatro ovelhas conceberam, cada uma, um cordeiro sadio. A outra ovelha gerou um cordeiro, que veio a óbito quatro horas após o nascimento. À necropsia verificou-se no seu útero a presença de um feto. Diferentemente ao que normalmente ocorre na primoinfecção, neste grupo nasceram 66,6% de cordeiros saudáveis, 16,7% de cordeiros debilitados, que morreram poucas horas após o parto e 16,7% de fetos.

As ovelhas reinfectedas com 80 dias de gestação (grupo II) produziram sete cordeiros, sendo quatro saudáveis (57,13%), um com malformação nos quatro

membros (14,29%), um que veio a óbito 48 horas após o nascimento (14,29%) e outro natimorto (14,29%).

As ovelhas reinfectedas com 120 dias de gestação (grupo III) geraram oito cordeiros, destes um era saudável (12,5%), dois apresentavam malformações nos quatro membros (25,0%), dois vieram a óbito três horas após o nascimento (25,0%), um feto macerado (12,5%) e dois natimortos (25,0%).

As ovelhas do grupo IV (apenas primoinfectadas) produziram quatro cordeiros, sendo dois saudáveis (50%); um debilitado, que veio a óbito duas horas após o nascimento (25%) e um natimorto (25%). A ovelha 1017 veio a óbito com, aproximadamente, 123 dias de gestação, em decorrência de toxemia da gestação. Esta ovelha apresentava cinco fetos em seu útero, fato que provavelmente ocorreu, em consequência do protocolo de sincronização de estro, que provocou uma superovulação.

Os resultados obtidos, principalmente, em relação ao GIV (apenas primoinfectadas), comprovam as sugestões de BUXTON et al. (2007) que ovelhas persistentemente infectados com *T. gondii* podem transmitir a infecção congenitamente com maior frequência que o esperado, provavelmente, em decorrência da reagudização da infecção. Portanto, a hipótese de que a primoinfecção protege contra a reinfecção, sendo utilizada como base para muitos produtores rurais não descartarem ovelhas com histórico de aborto, deve ser rejeitada.

Pesquisadores da Inglaterra (DUNCANSON et al., 2001; MORLEY et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005; MORLEY et al., 2007) propuseram que transmissões transplacentárias repetidas por *T. gondii* em ovinos podem ser mais comuns do que se acreditava anteriormente. No entanto, todas as provas apresentadas foram baseadas na detecção de DNA do *T. gondii* por PCR (DUBEY, 2009).

Os resultados verificados na presente pesquisa estão de acordo com os achados citados por DUNCANSON et al. (2001); MORLEY et al. (2005); WILLIAMS et al. (2005) e MORLEY et al. (2007).

Altas taxas (61%) de transmissão congênita foram relatadas em rebanhos comerciais (placenta e tecidos fetais), utilizando-se a PCR. *T. gondii* foi isolado em 94%

das gestações que resultaram em mortes e 42% das que vieram a termo (DUNCANSON et al., 2001).

WILLIAMS et al. (2005) detectaram altos níveis de transmissão congênita em ovelhas da raça Charollais (50,5%) e em rebanhos comerciais, sem raça definida (69%) por meio da PCR. Entretanto, não foi possível comprovar se a transmissão congênita ocorreu na primoinfecção ou com a reativação da infecção crônica durante a gestação, porém, os autores sugerem que em decorrência dos altos níveis de transmissão deve ter havido reativação da infecção toxoplásmica.

Conforme MORLEY et al. (2005), uma hipótese para explicar as diferenças familiares observadas pelo fato de algumas famílias de ovelhas Charolesas serem geneticamente mais suscetíveis à infecção por *T. gondii* e/ou aborto, sendo estas características transmitidas para suas gerações. Pouco se sabe sobre as diferenças na susceptibilidade do hospedeiro ao *T. gondii*. Outra hipótese é que a transmissão vertical do *T. gondii* ocorre, de geração em geração, após uma infecção primária, resultando na manutenção de elevados níveis de infecção em algumas famílias, enquanto em outras não. Este padrão é mimetizado pela ocorrência de aborto em mesmas famílias, devido à forte correlação entre a infecção e o aborto. A crença que o *T. gondii* pode ser transmitido para os descendentes de linhagens familiares infectadas, ao longo de sucessivas gerações é controversa, entretanto, não deve ser descartada.

De acordo com MORLEY et al. (2007) existe um alto risco (55%) de se produzir um natimorto depois de um aborto anterior, provavelmente associado a toxoplasmose. Também é descrito que um terço dos abortos ovinos diagnosticados está relacionado à infecção toxoplásmica, razão pela qual, mais estudos devem ser conduzidos sobre a imunidade adquirida na primoinfecção pelo *T. gondii*, ao longo da vida, além da sua transmissão para a prole.

RODGER et al. (2006) falharam ao tentar detectar transmissão congênita em ovinos persistentemente infectados. Trinta e uma ovelhas naturalmente soropositivas para *T. gondii* e 15 ovelhas soronegativas foram acasaladas e controladas durante a gestação. Não foi encontrada nenhuma evidência da presença do *T. gondii* nos exames (histopatologia ou PCR) realizados na placenta e nos tecidos de cordeiros. Títulos

sorológicos baixos foram encontrados em três cordeiros, mas não foi possível estabelecer se esses anticorpos representam indícios de infecção toxoplásmica fetal.

A transmissão congênita de *T. gondii* em ovelhas primoinfectadas é amplamente citada na literatura. Por outro lado, inexiste nesta mesma literatura consultada, estudos sobre reinfecção por *T. gondii* de ovelhas em diferentes fases gestacionais. Além disto, todos os trabalhos citados baseiam-se, apenas na detecção de DNA pela PCR da placenta e de tecidos fetais.

Portanto, de acordo com os resultados (clínicos, sorológicos, bioprova, histopatologia e PCR) obtidos na presente pesquisa pode-se comprovar a transmissão congênita em ovelhas persistentemente infectadas e em ovelhas reinfectadas, em diferentes fases gestacionais, por *Toxoplasma gondii*.

6 CONCLUSÕES

- a) A imunidade adquirida na primoinfecção não protegeu ovelhas Santa Inês contra futuras reinfecções por cepas heterólogas de *Toxoplasma gondii*.
- b) Parasitismo tissular por *T. gondii* pôde ser diagnosticado nas fêmeas (infectadas e reinfectadas) e seus respectivos cordeiros, por meio de três importantes métodos laboratoriais (RIFI, bioensaio em camundongo e PCR).
- c) Ovelhas persistentemente infectadas com *T. gondii* transmitiram a infecção (congênita), possivelmente, em decorrência de um processo de reagudização.
- d) A reinfecção por *T. gondii* desencadeou severas alterações reprodutivas (locomotoras, malformações, natimortos e debilidade) em ovelhas Santa Inês primoinfectadas, em diferentes fases gestacionais.
- e) Portanto, os resultados obtidos comprovam que toxoplasmose congênita pode ocorrer tanto em ovelhas persistentemente infectadas como em ovelhas reinfectadas.

7 REFERÊNCIAS

ACHA, P. N. & SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales. 2.ed. Washington: **Organization Panamericana de la Salud**, (Publicación Científica 503). 1986.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. Techniques for the brucellosis laboratory. **Paris: Institut National de la Recherche Agronomique**, 190p, 1988.

AMARAL, V.; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M. M. Sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente, dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil. **O Biológico**. v.12, p.331-340, 1978.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R.A., GENNARI S. M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91-106, 2004.

AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**, 4.ed. São Paulo, Savier, 1995, 154p.

AQUIZERATE F., CAZENAVE J., POIRIER L., VERIN P.H., CHEYROU A., BEGUERET J. & LAGOUTTE F.. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humour by the polymerase chain reaction. **The British Journal of Ophthalmology**. v.77, n.1, p.107-109. 1993

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.P.; PINTO, V.; SAKAMOTO, C.A.M.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**. v. 123, p.190-194, 2009.

ARIAS, M.A.; CHINCHILLA, M.; REYES, L.; LINDER, E. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in humans possible transmission routes in Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical*, v. 44, p. 377-381, 1996.

ASLANTAS, Ö.; ÖZDEMİR, V.; KILIC, S.; BABÜR, C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. ***Veterinary Parasitology***. v.129, p.187-191, 2005.

AVMA - American Veterinary Medical Association - Note for Guidelines on Euthanasia. 36p, 2007.

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

BEVERLEY J. K. A., WATSON W. A., SPENCE, J. B. The pathology of the foetus in ovine abortion due to toxoplasmosis. ***Veterinary Record***, v.88, p.174-178, 1971.

BLACK, M. W. AND BOOTHROYD, J.C. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, v.64, p.607-623. 2000.

BOHNE W, HEESEMANN J, GROÛ U (1993) Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. ***Infection and Immunity*** 61: 1141±1145

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; SILVA, E. M. K. et al. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v.30, p.21-25, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. ***Boletim Eletrônico Epidemiológico***, v.6, n.3, 2006.

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

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; TONIOLLO, G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; KANAMURA, C.; MORAES, F.R.; PERRI, S.H.V.; GENNARI, S.M. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. **Parasitology Research**. v. 104, p. 1213-1217, 2009.

BUENO, M.S.; CUNHA, E.A.; VERÍSSIMO, C.J.; SANTOS, L.E; LARA, M.A.C.; OLIVEIRA, S.M.; SPÓSITO FILHA, E.; REBOUÇAS, M.M. Infecção por nematodos em razas de ovelhas carnicas criadas intensivamente em la região del sudeste del Brasil. **Archivos de zootecnia**, Madrid, v. 51, p. 273-280, 2002.

Buxton, D. e Innes, E.A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, 110 (Suppl.), p.S11-S16. 1995.

BUXTON, D.; RODGE, S.M.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.E. Toxoplasmosis: The possibility of vertical trnasmission. **Small Ruminant Research**. v.62, p.43-46, 2006.

BUXTON, D.; S. MALEY, W.; WRIGHT, S. E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.25-28, 2007.

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.

CAPORALI, E.H.G.; SILVA, A.V.; MENDONÇA, A.O.; LANGONI, H. Comparação de métodos para determinação da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em

suínos dos Estados de São Paulo e Pernambuco - Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.8, n.1, p.19-24, 2005.

CAVALCANTE, G.T., AGUIAR, D.M., CHIEBAO, D.P., MEIRELES, L.R., ANDRADE, H.F., CAMARGO, L.M.A., LABRUNA, M.B., RUIZ, V.L.A., GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em humanos e animais domésticos da zona Monte Negro, Rondônia. Thirteenth Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ouro Preto, Minas Gerais, vol. 13 (Suplemento), Brasil, 20-24 de setembro de 2006, **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** 217, 2004.

CDC, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>
Acesso em 14 de dezembro de 2011.

CHHABRA, M. B.; GUPTA, S. L.; GAUTAM, O. P. Toxoplasma seroprevalence in animals in Northern Índia. **International journal of zoonoses**, v.12, p.136-142, 1985.

CHIARI, C. A.; NEVES, D. P.; PEREIRA NEVES, D. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, n.3, p.337-340, 1984.

CLEMENTINO, M. M.; SOUZA, M. F.; ANDRADE NETO, V. F. Soroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.199-203, 2007.

COLE, C.R.; SANGER, V.L.; FARREL, R.L.; KORNDER, J.D. The present status of toxoplasmosis in veterinary medicine. **North. An. Veterinarian**. v.35, p.265-70, 1954.

COLE, JR., SULZER, C.R., PULSSELY, P.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. **Applied Microbiology**, v.25, n.6, p.976-980, 1973.

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

CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J.P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostical Investigations**, v.5, p.572-578, 1993.

COSTA A. J.; ARAÚJO, F. G.; COSTA. J. O.; LIMA, J. D.; NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Journal for Parasitology**, v.6, n.2, p.212-218, 1977.

COSTA, A. J.; ÁVILA, F. A.; KASAI, N.; PAULILLO, A. C.; SILVA, M. B.; GALESCO, H. Anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em soros de bovinos do município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.45, n.4, p.299-302, 1978

DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**. v.97, n.3, p.191-198, 2001.

DA SILVA, A. V.; CULOTO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da reação de Reação de Imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soro de ovino, caprino, canino e felino. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 69, n.1, p.7-11, 2002.

DESMONTS, G. e REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, p.562-568, 1980.

DUBEY, J.P. Experimental toxoplasmosis in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **International Goat and Sheep Research**, v.2, p.93-104, 1984.

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.205, n.11, p.1593-1598, 1990.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming of human and animals. In: KREIER, J.P. **Parasitic protozoa**. 2 ed., San Diego: Academic Press. p.1-157, 1993.

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

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**. v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995.

DUBEY, J. P. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. **Journal of Parasitology**, v.82, p.951-956, 1996.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v.74, p.75-7, 1998.

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

DUBEY, J.P., 2007. ***Toxoplasma gondii***. In: The Model Apicomplexan-Perspective And Methods, Weiss, L.D. and K. Kim (Eds.). Elsevier, London.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.1-14, 2009.

DUBEY, J.P. e BEVERLEY, J. K. A .**Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: Academic,1988. 315p.

DUBEY, J. P. e FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v.19, p.155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**. v. 11, p. 350-379, 1974.

DUBEY, J.P., HAMIR, A.N. Experimental toxoplasmosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Journal of Parasitology**. v.88, p.514-9, 2002.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**. 66: 111-19, 1980.

DUBEY, J. P. e THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal Veterinary Research**, v.54, n.3, p.270-273, 1993.

DUBEY, J. P. e BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: **CRC Press Inc.**, p.01-220., 1988.

DUBEY JP, MILLER NL, FRENKEL JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**, v.132, p.636-62, 1970.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 67-69, 1998.

DUBEY, J.P., SUNDAR, N., HILL, D., VELMURUGAN, G.V., BANDINI, L.A., KWOK, O.C.H., MAJUMDAR, D., SU, C., High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. , **International Journal for Parasitology**. v.38, p.999– 1006. 2008.

DUMÈTRE, A.; AJZEMBERG, D.; ROZETTE, L.; MERCIER, A.; DARDEÉ, M. L. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis, **Veterinary Parasitology**. v.20, n.142(3-4), p. 376-379, 2006.

DUNCANSON, P.; TERRY, R. S.; SMITH, J. E; HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock, **International Journal for Parasitology**, v.31, n.14, p.1699-1703, 2001

ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v.28, p.1053-60, 1998.

ESTEBAN REDONDO; MALEY, S.W.; THOMSON, K.; NICOLI, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**.86: 155-71, 1999.

ESTEBAN-REDONDO, I. e INNES, E.A. (1998)Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts, **International Journal for Parasitology**. , 28(9), pp. 1459-66.

FARIA, E. B.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, M. L. C. R.; AZEVEDO, S. S. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.126–129, 2007.

FAYER, R. Toxoplasmosis update and public health implications. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 22, p.344-352, 1981.

FIALHO, C. G. e ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre–RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.893-897, 2003.

FIGLIUOLO, L. P. C., KASAI N., RAGOZO A. M. A., PAULA V.S.O., DIAS R.A., SOUZA S.L.P., GENNARI S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 123, p161-166, 2004.

FIGUEROA DAMIAN, R. Risk of transmission of infectious diseases by transfusion. **Ginecol Obstet Mex.**, v. 66, p. 277-283, 1998.

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

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis in human beings. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, n.2, p. 240-248, 1990.

FRENKEL, J.K.; HASSANEIN, K.M.; HASSANEIN, R.S.; BROWN, E.; THULLIEZ, P.; QUITERONUNEZ, R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama-City. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, p. 458-468, 1995.

FRENKEL, J.K.; PARKER, B.B. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of Xenosmophilia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 791, p. 402-407, 1996.

FREYRE, A.; FIALHO, C.G.; BIGATTI, L.E.; ARAUJO, F.A.P.; FALCÓN, J.D.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Congenital transmission in a hamster model. **Experimental Parasitology**. v. 122, p. 140-144, 2009.

FUENTES, S.I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C.J.; FERNANDO, C.C.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 2368-2372, 1996.

FULTON J. D. e TURK, J. K. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. **Lancet**, v.2, p.1068, 1959.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; PEREIRA, A. B. L.; SINHORINI, I. L. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**. v.113, n.2, June 2006, Pages 100-105, 2006.

GARNHAM AND LAINSON, 1960 P.C.C. Garnham and R. Lainson, Sheep as a potential reservoir of *Toxoplasma* for man. **Lancet**, v.2, p.71–74, 1960.

GAUSS, C.B.L.; DUBEY, J.P.; VIDAL, D.; RUIZ, F.; VICENTE, J.; MARCO, I.; LAVIN, S.; GORTAZAR, C.; ALMERÍA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.1-2, p.151-156, 2005.

GIRALDI, N., VIDOTTO, O., NAVARRO, I. T., GARCIA, J. L., OGAWA, L., KOPYKA, E. *Toxoplasma* antibody and stool parasites in public school children, Rolândia, Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35 n.3, 2001.

GLASNER, P.D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MERTINS, M.C.; BURNER, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M.E.; NUSSENBLER, R.B.; KASLOW, R.A.; BELFORT, R. An Unusually High prevalence of Ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, p. 136-144, 1992.

GOLDSMITH, R. S. Infectious Diseases: Protozoal & Helminthic In: **Current Medical Diagnosis & Treatment**. 37th Edition Stamford, Connecticut. USA: Appleton & Lange. 1998.

GONDIM L.F.P., BARBOSA JR, H.V., RIBEIRO FILHO, C.H.A., SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J. Counn. Sci. Ind. Res. Aust.**, v. 12, p. 50-52. 1939.

HALONEN, S.K., TAYLOR, G.A., WEISS, L.M. Gamma interferon- induced anhibition of *Toxoplasma gondii* in astrcytes is mediated by IGIP . **Infection and Immunity**., v. 69, p. 5573-6, 2001.

HARTLEY, W.J.; MOYLE, G.G. Further observations on the epidemiology of ovine *Toxoplasma* infection. **Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science**, v.52, p.647-53, 1974.

HARTLEY, W.J. Experimental transmission of toxoplasmosis in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v.9, p.1-6, 1961.

HASHEMI-FESHARKI, R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. **Veterinary Parasitology**. v.61, n.1-2, p.1-3, 1996.

HOWE DK AND SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal Infection Diseases**, 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n.2, p. 134-139, 2007.

HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v.206, p.961-962, 1965.

HUYNH, M.-H., RABENAU, K. E., HARPER, J. M., BEATTY, W. L., SIBLEY, L. D. AND CARRUTHERS, V. B. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. **EMBO Journal**, v.22, p.2082-2090, 2003.

IBGE, 2010. Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=1>. Acesso em 14 de dezembro de 2011.

JACOBS, G.G. MOYLE AND R.R. RIS, The prevalence of toxoplasmosis in New Zealand sheep and cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.24, p.673-675, 1963.

JACOBS, L. The occurrence of *Toxoplasma* infection in the absence of demonstrable antibodies. **Proc. 1st International Congress of Parasitology**, v.1, p. 176-177, 1964.

JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions, and in microphtalmic eye, with parasites in the retina. **Casopis Lekaru Ceskych**, v.62, p.1021-1027, 1923.

JITTAPALAPONG, S. ; SANGVARANOND, A.; PINYOPANUWAT, N.; CHIMNOI, W.; KHACHAERAM, S.; KOIZUMI, W.; MARUYAMA S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.1, p.23-28, 2005.

JUNGERSEN, G., JENSEN, L., RASK, M.R., LIND, P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.25, p.187–195, 2002.

KHETSURIANI, N., HOLAMAN, R.C., ANDERSON, L.J. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988-1997. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, n.2, p. 175-82, 2002.

KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**. v. 118, n. 3, p. 212-216, 2005.

LANGONI, H. et al. Inquérito soropidemiológico para a toxoplasmose em ovinos no Estado de São Paulo, Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v.61, n.1, p.35-39, 1999.

LAPPIN, M.R. Feline Zoonotic Diseases. **Veterinary Clinicals of North American Small Animal Practice**, v.23, n.1, p.57-77, 1993.

LAPPIN, 2004 LAPPIN, M. R. **Doenças causadas por protozoários**. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.430-435.

LARSSON, C.E.; JAMRA, L.M.F.; GUIMARÃES, E.C. Prevalência da toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.14, p.582-588, 1980

LEHMANN, T., BLACKSTON, C.R., PARMLEY, S.F., REMINGTON, J.S., DUBEY, J.P., Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. **Journal for Parasitology**, v.86, p.960–971, 2000.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P., BUTLER, J. M., BLAGBURN, B. L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v.73, n.1, p.27-33, 1997.

LINDSTRÖM, I; KADDU-MULINDWA, D. H.; KIRONDE, F.; LINDH, J. Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. **Acta Trop.**, v.100, p.218-222, 2006.

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

LOPES, W.D.Z. **Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*Ovis aries*) machos experimentalmente infectados**. Jaboticabal, FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, 2007. 113p. (Dissertação de Mestrado).

LOPES, W.D.Z., COSTA, A.J., SANTANA, L.F., SANTOS, R.S., ROSSANESSE, W.M., LOPES, W.C.Z., COSTA, G.H.N., SAKAMOTO, C.A., SANTOS, T.R. Aspects of *Toxoplasma* Infection on the Reproductive System of Experimentally Infected Rams (*Ovis aries*). **Journal of Parasitology Research**. p. 1-6, 2009.

LOPES, W.D.Z., SANTOS, T.R., SANTOS, R.S., ROSSANESE, W.M., SOUZA, F.A.; RODRIGUES, J.D.F.; MENDONÇA, R.P.; SOARES, V.E.; COSTA, A.J. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. **Research Veterinary Science**, v.88, p.104-106, 2010.

LOPES, W.D.Z **Transmissão sexual de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em ovinos (*Ovis aries*)**. Jaboticabal, FCAV – Universidade Estadual Paulista, 2011. 152p. (Tese de Doutorado).

LUNDE, M.N., JACOBS, L. Antigenic Differences between Endozoites and Cystozoites of *Toxoplasma gondii* **The Journal of Parasitology**, v.69, n.5, p.806-808, 1983

LUFT, R. Z.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis . **The Journal of Infectious Diseases.**, v.157, p.01-06, 1988.

MAIA, M.S. **Manual de Inseminação artificial em Caprinos e Ovinos.** Sebrae/RN. 1998. 49p.

MAINAR, R.C., CRUZ, C. DE LA, ASENSIO, A., DOMÍNGUEZ, L., VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. **Veterinary Research Communications.**, v.20, p.153–159, 1996.

MALIK, M.A., D.W. DEESEN AND A. CRUZ Toxoplasmosis in sheep in northeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, p.263-265, 1990.

MAMIDI, A., DE SIMONE, J. A., POMERANTZ, R. J. Central nervous system infectious in individuals with HIV-1 infection. **Journal For Neurovirology**, v.8, n.3, p.158-67, 2002.

MARONPOT, R.R.; BOTROS, B.A.M. *Toxoplasma* serologic survey in man and domestic animals in Egypt. **The Journal of the Egyptian Public Health** v.47, p.58-67, 1972.

McCOLGAN, C., BUXTON, D. AND BLEWETT, D. A. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. **Veterinary Record**, v.123, p.467–470, 1988.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO JR, A. J.; ANDRADE JR., H. F. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.267-271, 2003.

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**, Lawrence, v.58, n.5, p.928-937, 1972.

MILLER, JR., BLEWETT, DA. AND BUXTON, D., Clinical and serological response of pregnant gimmers to experimental induced toxoplasmosis. **Veterinary Record**, v.111,p.124-126, 1982.

MINHO, A.P.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MANARA, E.M.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Avaliação dos testes de Reação de Imunofluorescência indireta e aglutinação modificada para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos infectados experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.199-202, 2004.

MIRÓ, G.; MONTOYA, 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. **Veterinary Parasitology**, v.126, n.3, p.249-255, 2004.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. **Toxoplasmosis**. Lancet, London, v.363, n.9425, p.1965-1976, 2004.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMIREZ, C.; FUENTS, I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**. v.160, p. 159-162, 2009.

MORAES, F.R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ROSSI JUNIOR, P.; WOLFF, F.M.; CASTILHO, G.G. Susceptibilidade de ovinos das raças Suffolk e Santa Inês à infecção natural pro tricostrongilídeos. **Archives of Veterinary Science**, v.6, p.63-69, 2000.

MORLEY, E. K.; WILLIAMS, R. H.; HUGHES, J. M.; TERRY, R. S.; DUNCANSON, P.; HIDE, G. Significant familial differences in the frequency of abortion and *Toxoplasma*

gondii infection within a flock of Charollais sheep. **Parasitology**. v. 131, p. 181-185, 2005.

MORLEY, E.K., WILLIAMS, R. H., HUGHES, J.M., THOMASSON, D., TERRY, R. S., DUNCANSON, P., SMITH, J. E., HIDE, G. Evidence that primary infection of Charollais sheep with *Toxoplasma gondii* may not prevent foetal infection and abortion in subsequent lambings. **Parasitology**, v.135, p.169-173, 2008.

MOURA, A. B., COSTA, A.J.; FILHO, J. S.; PAIM, B. B.; PINTO, F. R.; DI MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.430-434, 2007.

MUNIR, A.; ZAMAN, M.; ELTORKY, M. *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pancreas transplant patient. **The Southern Medical Journal** , v.93, n.06, p.614-617, 2000.

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

NETO, J.O.A., AZEVEDO, S.S., GENNARI, S.M., FUNADA, M.R., PENA, H.F.J., ARAÚJO, A.R.C.P., BATISTA, C.S.A., SILVA, M.L.C.R., GOMES, A.A.B., PIATTI, R.M., ALVES, C.J. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 159, p. 329-332, 2008.

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

NISHIKAWA, H.; ARNONI, J.V.; RASSIER. D.S.S.; SILVA, S.S. **Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals in Rio Grande do Sul State, Brazil**. Resumos I Encontro de Pesquisas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 1984, 62p.

OLAFSON, P. & MONLUX, W.S. *Toxoplasma* infection in animals. **Cornel. Vet.** 32, 316-6, 1942.

OWEN, M.R., TREES, A.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **Journal of Parasitology**, v.85, p.382–384, 1999.

OWEN, M. R.; CLARKSON, M. J.; TREES, A. J. Acute phase *Toxoplasma* abortions in sheep. **Veterinary Record**. v. 142 p. 480-482, 1998.

PAIXÃO, T. A. e SANTOS, R. L. Encefalite por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães. **Clínica Veterinária**, v.9, n.48, p. 44-52, 2004.

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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.42, n.3, p. 141-5, 2000.

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

PINHEIRO, J.W.; MOTA, R.A.; FONSECA, A.A.; FARIA, E.B.; GONDIM, L.F.P.; SILVA, A.V.; ANDERLINI, G.A. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. **Parasitology Research** v.105, p.709-715, 2009.

PINKERTON, H. e HENDERSON, R.G. Adult toxoplasmosis. A previously unrecognized disease entry simulating the typhus-spotted fever group. *Journal American Medical Association*, v.116, p.807-814, 1941. Apud AMATO NET, V.; MEDEIROS, E.A.S.; LEVI, G.C.; DUART, M.I.S. **Toxoplasmose**. 4.ed. São Paulo:, Savier, 1995, p.154.

PINKERTON, H.; WEINMAN, D. **Toxoplasma infection in man**. Archives of Pathology, Chicago, v.30, p.374, 1940.

POTASMAN, I.; ARAUJO, F.G.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. *Toxoplasma gondii* antigens recognized by sequential sample of serum obtained from congenitally infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1926-1931, 1987.

PRADHAN, S.; YADAV, R.; MISHRA, V. N. *Toxoplasma* meningoencephalitis in HIV-seronegative patients: clinical patterns, imaging features and treatment outcome. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, p.25-33, 2007.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Influence of reproduction status on susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 55, p.65-75, 2004.

RODGER, S.M., MALEY, S.W., WRIGHT, S.E., MACKELLAR, A., WESLEY, F., SALES, J., BUXTON, D. Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep. **Veterinary Record**, v.159, p.768–772, 2006.

ROMANELLI, P.R., FREIRE, R.L., VIDOTTO, O., MARANA, E.R.M., OGAWA, L., DE PAULA, V.S.O., GARCIA, J.L., NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana' State, Brazil. **Research Veterinary Science**, v.82, p.202–207, 2007.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis — prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v.21, n.4, p.458-472, 2006.

SAAD, R.; VINCENT, J.F.; CIMON, B.; DE GENTILE, L.; FRANCOIS, S.; BOUACHOUR, G.; IFRAH, N. Pulmonary toxoplasmosis after allogeneic bone marrow transplantation: case report and review. **Bone Marrow Transplant**, v.18 p. 211-212, 1996.

SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*T. gondii*). **Science**, Washington, v.108, p.660-663, 1948.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal American Medical Association**, v.116, p.801-807, 1941.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-91, 1988.

SANTOS T.R., COSTA A.J., TONIOLO G.H., LUVIZOTTO M.C.R., BENETTI A.H., SANTOS R.R., MATTA D.H., LOPES W.D.Z., OLIVEIRA J.A. & OLIVEIRA G.P. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.324-326, 2009.

SANTOS T.R., NUNES, C.M., LUVIZOTTO, M.C.R., MOURA, A.B., LOPES, W.D.Z., COSTA, A.J. BRESCIANI, K.D.S. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. **Veterinary Parasitology**, v.171, p.53–57, 2010.

SAS, Institute, 2001. **SAS® User's Guide: Statistics**. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.

SAWADOGO, P.; HAFID, J.; BELLETE, B.; SUNG, R. T. M.; CHAKDI, M.; FLORI, P.; RABERIN, H.; HAMOUNI, I. B.; CHAIT, A.; DALAL, A. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Veterinary Parasitology**, v.130, n.1-2, p.89-92, 2005

SCARPELLI, L.C., LOPES, W.D.Z., MIGANI, M., BRESCIANI, K. D. S., COSTA, A. J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 29, p. 59-64, 2009.

SHARMA, S.P.; GAUTAM, O.P. A note the prevalence of Toxoplasma antibodies among camels and pigs in Hissar. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.44, p.214-218, 1974.

SIKES, R.K. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.180, n.8, p.57-859, 1982.

SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, n.3, p.191-198, 2001.

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

SILVA, N.R.S. & COSTA, A.J. Frequência da toxoplasmose em ovinos dos municípios de Guaíba e São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq. Esc. Vet.** v. 3, p. 56-9, 1981.

SILVA, L. A., VIEIRA, R. S., SERAFINI, L. N., JUNIOR, C. G. C., FIGUEIREDO, J. F. C. Toxoplasmose do sistema nervoso central em pacientes sem evidência de imunossupressão: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.5, 2001.

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

SILVA, L. A., CUNHA, E. L. P., MEIRELES, L. R., GOTTSCHALK, MOTA, R. A., LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**. v.33 p. 115-119, 2003.

SILVA, K.L.V e DE LA RUE, M.L., Possibilidade de transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil.(Possibility of *Toxoplasma gondii* congenital transmission in sheep by serological follow-up in Rosário do Sul County, RS, Brazil). **Ciência Rural**, v.36, p.892–897, 2006.

SILVA, D. A. O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 234–244, 2007.

SILVA, R. C., LANGONI, H., SU, C., DA SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.173-177, 2011.

SMITH, K.E.; ZIMMERMAN, J.J.; PATTON, S.; BERAN, G.W.; HILL, H.L. The epidemiology of toxoplasmosis on Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. **Veterinary Parasitology**. v. 42, p.199-211, 1992.

SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. Editora Manole, São Paulo. V.1,2, 1993. 1738p.

SOARES, H.S., AHID, S.M.M., BEZERRA, A.C.D.S., PENA, H.F.J., DIAS, R.A., GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.211–214, 2009.

SOUZA, L. M. **Neosporose e toxoplasmose bubalina: estudo da situação sorológica em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo**. 2001. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parasita dei Gonigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia chericorda in multipunti il Kala-Azar dell Uomo. **Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo**, São Paulo, v.3, p.109-112, 1908.

SPÓSITO FILHA, E.; AMARAL, V.; MACRUZ, R.; REBOUÇAS, M.M.; SANTOS, S.M.; DRUMOND, L.S. *Toxoplasma gondii* em ovinos: Isolamento do parasita a partir de diafragmas de animais procedentes do Estado do Rio Grande do Sul e abatidos em matadouros de São Paulo, para consumo humano. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, p.117-119, 1992.

STEUBER, V.; NIU, A.; BAUER, C.; REETZ, J.; ROTH, A.; JANITSCHKE, K. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of ovine abortions using polymerase chain reaction. **Dtsch tierärztl Wschr**, v.102, p.91-94, 1995.

SUARÉZ-ARANDA et al., 2000 SUARÉZ-ARANDA, F.; GALISTEO JR, A.J.; HIRAMOTO, R.M.; CARDOSO, R.P.A; MEIRELES, L.R.; MIGUEL, O.; ANDRADE JR., H.F. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 1-2, p. 23-32, 2000.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S.J. (Ed.), **Textbook of veterinary internal medicine**. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p. 265-297.

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

TODD, E. C. D. Preliminary estimates of costs in foodborne disease in the United States. **Journal of food protection**, v. 52, p. 595-601, 1989.

TORRES, C. M. Affinité de l'Encephalitozoon chagasi agent étiologique d'une méningoencephalomyélite congénitale avec myocardite et myosite chez l'homme. C. R. Soc. Biol., v.97, p.1797-1799, 1927. Apud: AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**, 4.ed. São Paulo, Savier, 1995, 154p.

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

UCHÔA, C. M. A.; DUARTE, R.; LAURENTINO-SILVA, V.; ALEXANDRE, G. M. C.; FERREIRA, H. G. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.661-669, 1999.

UENO, T.E.H., GONÇALVES, V.S.P., HEINEMANN, M.B., DILLI, T.L.B., AKIMOTO, B.M., de SOUZA, S.L.P., GENNARI, S.M., SOARES, R.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 547–552, 2009.

VAUGHAN, L. Abortion in sheep. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary**. v.49, n.3, p.170-174, 1996.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T.; MOCO, C. A., et al. **Prevalência de *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em matadouros no norte do Paraná**. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 2., 1986, Londrina.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v.13, p.69-75, 1992.

WATSON W.A., BEVERLEY, J.K.A. Ovine abortion due to experimental toxoplasmosis. **Vet. Rec.**, v.88, p.42-45, 1971.

WILLIAMS, R.H., MORLEY, E.K., HUGHES, J.M., DUNCANSON, P., TERRY, R.S., SMITH, J.E., HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. **Parasitology**. v. 130, p. 1–7, 2005.

WOLF, A.; COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. **Bulletin of the Neurological Institute of New York**, New York, v.6, p.306-371, 1937.

WONG, S. Y. e REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **Aids**, v. 07, n.03, p.299-316, 1993.

WORK, K. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the flesh of sheep, swine and cattle. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v.71, p.296-299, 1967.

WYSS, R.; SAGER, H.; MULLER, N. et al. Distribution of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* under aspects of meat hygiene. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v.142, n.3, p.95-108, 2000.

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. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 1987-1996, 2004.

YU, J.; XIA, Z.; LIU, Q.; LIU, J.; DING, J.; ZHANG, W. Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.79-85, 2007.

ZIA-ALI, N., FAZAELI, A., KHORAMIZADEH, M., AJZENBERG, D., DARDÉ, M., KESHAVARZ-VALIAN, H. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. **Parasitology Research**, v.101 , p.111–115, 2007.