MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

EDUARDO DA COSTA ALVES

TOXOPLASMA GONDII: SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E VIRULÊNCIA DE CEPAS OBTIDAS DE GALINHAS CAIPIRAS (*GALLUS DOMESTICUS*) COMERCIALIZADAS EM FEIRAS LIVRES DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA

Orientadora:
Profa. Dra. Joanna D'Arc Aparecida Herzog Soares
Co-orientadora:
Profa. Dra. Ana Maria de Castro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Goiânia – GO, 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

EDUARDO DA COSTA ALVES

TOXOPLASMA GONDII: SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E VIRULÊNCIA DE CEPAS OBTIDAS DE GALINHAS CAIPIRAS (*GALLUS DOMESTICUS*) COMERCIALIZADAS EM FEIRAS LIVRES DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA

Orientadora:
Profa. Dra. Joanna D'Arc Aparecida Herzog Soares
Co-orientadora:
Profa. Dra. Ana Maria de Castro

Dissertação submetida ao PPGMT/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical na área de concentração de Parasitologia.

Goiânia – GO, 2007

Para meu amado tio Antenor Ferreira Alves (*in memoriam*), com infinita saudade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado uma família maravilhosa, uma esposa sensacional e amigos de tão valiosa estima;

A meu pai Sidney (*in memoriam*), minha irmã Mara e o novo membro da família meu sobrinho Miguel, pessoas cuja distância e saudade em alguns momentos parecem não ter mais fim;

Ao meu tio Antenor (*in memoriam*), pessoa que é para mim símbolo de bondade e carinho, cuja ausência é irreparável na minha vida;

Ao meu tio José Antônio, pessoa que me deu todo o suporte possível em uma nova cidade, sem o qual muito provavelmente eu não conseguiria chegar até aqui;

A minha mãe Iracy e minha mãe/avó Maria do Carmo, razões da minha vida e cujo amor e saudade eu não teria como colocar em palavras;

A minha esposa Fabiana, pela paciência e compreensão nos momentos de stress, te amo muito;

Ao meu padrasto Assis, pessoa de coração bondoso que é um amigo e segundo pai para mim;

A professora Joanna D'arc Herzog pela amizade, por confiar no meu trabalho e por me dar a oportunidade de trabalhar com uma paixão que é o *Toxoplasma gondii;*

Ao amigo Marcos Gontijo da Silva, pessoa de preciosa personalidade que sente prazer ao ajudar e ensinar, cujo tipo de amizade eu realmente acreditava que não encontraria mais;

Ao amigo Fábio de Faria Vasconcelos, pessoa de gosto musical duvidoso, porém de coração e inteligência enormes, cuja rara amizade espero levar comigo durante toda a vida;

Aos professores Ruy de Souza Lino Junior e Flávia Aparecida de Oliveira do setor de Patologia pela valiosa ajuda no estudo histológico;

Ao professor Alverne Passos Barbosa e ao mestrando Jaime pela paciência com as constantes pesagens de reagentes;

Ao professores Wolf Christian Luz e Adelair Helena dos Santos sempre dispostos a ajudar independente do momento;

A Sueli Meira e a todas amigas do laboratório Margarida Dobler Komma pela paciência e ajuda com o microscópio de epifluorescência;

Ao José Clementino (Zezinho) e a Kariny da secretaria de pós-graduação, muito obrigado pela atenção, paciência e presteza em tirar todas as dúvidas e ajudar;

A todos os professores do IPTSP-UFG por compartilhar um pouco do seu conhecimento que espero carregar comigo para sempre;

A todos do IPTSP-UFG por adotarem um carioca com tanto respeito e carinho, muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS..... VI

RESUMO..... VIII

ABSTRAT.....IX

1- INTRODUÇÃO.....1

2- REVISÃO DE LITERATURA..... 4

2.1- Histórico..... 4

2.2- Biologia do *T. gondii*..... .5

2.2.1- Ciclo no hospedeiro intermediário.....5

2.2.2- Ciclo no hospedeiro definitivo.....5

2.2.3- Formas infectantes.....6

2.2.4- Cepas de *T. gondii*.....8

2.3- Aspectos Epidemiológicos.....10

2.3.1- Soroprevalência em seres humanos.....11

2.3.2- Soroprevalência em animais.....12

2.3.3- Fontes de infecção.....15

2.3.4- Toxoplasmose em aves.....17

2.4- Lesões ocasionadas pela toxoplasmose.....18

2.4.1- Toxoplasmose em hospedeiro imunocompetente.....19

2.4.2- Toxoplasmose em hospedeiro imunossuprimido.....20

2.4.3- Toxoplasmose congênita..... 21

2.5- Resposta imunológica ao *T. gondii*..... 22

3- OBJETIVOS DO TRABALHO..... 25

3.1- Objetivos gerais.....25

3.2- Objetivos específicos..... 25

4- MATERIAIS E MÉTODOS.....26

4.1- Obtenção das amostras.....26

4.2- Processamento das amostras.....26

4.3- Processamento do sangue das aves.....27
4.4- Teste de Aglutinação Modificado (MAT) 27
4.4.1- Preparo do antígeno para o MAT.....27
4.4.2- Realização do MAT.....28
4.5- Bioensaio em camundongos.....29
4.5.1- Animais utilizados.....29
4.5.2- Processamento do coração das aves.....29
4.5.3- Processamento do cérebro das aves 30
4.5.4- Manipulação dos animais sintomáticos..... 30
4.5.5- Manipulação dos animais assintomáticos..... 31
4.6- Estudo da virulência dos isolados... 31
4.7- Obtenção do soro dos camundongos para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....32
4.8- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no soro dos camundongos.....33
4.9- Criopreservação dos isolados obtidos.....34
4.10- Confecção de lâminas das amostras de aves para estudo histológico 34
4.11- Confecção de lâminas das amostras de camundongos para estudo histológico..... 35
4.12- Seleção dos cortes para estudo histológico..... 36

5- RESULTADOS.....38
5.1- Prevalência de anticorpos pelo MAT.....38
5.2- Isolamento de *T. gondii* a partir de cérebro e coração de galinha..... 38
5.3- Estudo histológico de órgão das aves.....40
5.4- Comparação da virulência dos isolados obtidos.....40
5.5- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no soro dos camundongos.... 41
5.6- Estudo histológico de órgãos de camundongos.....42

6-DISCUSSÃO.....43

7- CONCLUSÕES..... 50

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....51

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Deficiência Imunológica Adquirida
BSA	Albumina Sérica Bovina
DL_{50}	Dose Letal Média
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DT	Dye Test
ELISA	Ensaio Enzimático de Imunoabsorção
HAART	Terapia Anti Retroviral Altamente Ativa
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IHAT	Teste de Hemaglutinação Direta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
INF-γ	Interferon gama
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
ISAGA	Ensaio de Aglutinação por Imunoabsorção
LAT	Teste de Aglutinação em Latex
MAT	Teste de Aglutinação Modificado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NK	Natural killer

PAS	Ácido Periódico De Schiff
PBS	Tampão fosfato salino
Ph	Potencial hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM	Rotação por minuto
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFG	Universidade Federal de Goiás
USA	Estados Unidos da América do Norte

RESUMO

Neste estudo, 50 galinhas caipiras foram obtidas nas feiras livres da cidade de Goiânia, seu soro foi testado para anticorpos anti *T. gondii* através do teste de aglutinação modificado (MAT), seus órgãos (coração e cérebro) foram processados e inoculados em grupos de 6 camundongos. Amostras dos órgãos das aves e dos camundongos sobreviventes foram corados com Hematoxilina-Eosina objetivando a busca de estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *Toxoplasma.* O soro dos camundongos sobreviventes foi analisado pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os isolados foram submetidos a estudo de virulência para camundongos através de inoculações com diferentes concentrações de taquizoítos. 25 aves (50%) mostraram-se positivas (MAT ≥ 1:5) obtendo um total de três isolados. Estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii* foram encontradas em cortes histológicos de oito aves (16%) e órgãos de camundongos de dois grupos (2%). Dos 25 experimentos com inóculos de aves soropositivas, em 11 (44%) houve a detecção de IgG anti*Toxoplasma*. Nas amostras de aves soronegativas, não foram encontradas evidências da presença de *Toxoplasma.* Dos três isolados obtidos, dois foram letais para camundongos a partir de concentrações de mil taquizoítos, enquanto outro foi 100% fatal a partir da concentração de dez mil taquizoítos.

ABSTRACT

In this study, 50 free-range chickens were obtained from free fairs of the city of Goiânia, its serum were tested for antibodies anti *T. gondii* with the modified agglutination test (MAT), its heart and brain had been processed and inoculated in groups of 6 mice. Samples of the organs of the birds and the surviving mice had been sectioned and stained with Hematoxylin-Eosin for the search of *Toxoplasma*-like cysts structures. The serum of the surviving mice was analyzed by the indirect immunofluorescence reaction (RIFI). The isolated ones had been submitted to the study of virulence for mice by inoculations with different concentrations of tachyzoites. 25 birds (50%) had revealed positive (MAT ≥ 1:5) getting a total of three isolated. *Toxoplasma*-like cysts structures had been found in histologic cuts of eight birds (16%) and organs of mice of two groups (2%). Of the 25 experiments with inoculeted of positives birds, in 11 (44%) it had the detention of IgG anti-*Toxoplasma*. In the samples of negatives birds, evidences of the presence of *Toxoplasma* had not been found. Of the three isolated, two had been lethal for mice from concentrations of a thousand tachyzoites., while another one was 100% fatal one from the concentration of ten a thousand tachyzoites.

1- INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns mundialmente (Montoya & Liesenfield 2004; Dubey & Beattie, 1988). O *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório que desenvolveu diversas vias potenciais de transmissão, sendo capaz de infectar provavelmente todos os animais de sangue quente, tornando-se um dos protozoários parasitas mais bem sucedidos (Tenter et al 2000; Boothruyd & Grigg 2002). Seu ciclo de vida é heteroxeno facultativo tendo todos os animais homeotérmicos como hospedeiros intermediários e os membros da família Felidae como hospedeiros definitivos. Nos hospedeiros intermediários ocorre a fase assexuada da reprodução, enquanto que nos felinos ocorre primeiramente uma fase assexuada seguida posteriormente por uma fase sexuada de reprodução, esta ocorrendo exclusivamente no epitélio intestinal dos felinos (Tenter et al 2000).

O parasito apresenta-se durante o seu ciclo de diversas formas evolutivas: taquizoítos, de formato crescente e multiplicação rápida, presentes na fase aguda da infecção; bradizoítos que são morfologicamente idênticos aos taquizoítos, porém com multiplicação mais lenta e funcionalmente diferentes, encontrados no interior de cistos teciduais presentes na fase crônica da infecção e esporozoítos que apresentam o mesmo formato e encontram-se no interior dos oocistos formados exclusivamente nos felinos. Os oocistos possuem formato esférico e são liberados nas fezes não esporulados, passando por tal processo no meio externo num período de 1 a 5 dias dependendo das condições ambientais (Montoya & Liesenfield 2004; Dubey 2004).

A toxoplasmose pode ser adquirida através da manipulação ou ingestão de carne contendo cistos teciduais, bebidas ou alimentos contendo oocistos esporulados, através de líquidos orgânicos ou ainda por via transplacentária (Montoya & Liesenfield, 2004; Dubey 2004). Em indivíduos imunocompetentes, a infecção geralmente é assintomática, porém em 10% destes surgem sintomas como linfadenopatia, coriorretinites e mais raramente miosites. Entretanto, se a primoinfecção materna ocorrer durante a gestação, o parasito pode invadir a

circulação fetal via infecção da placenta, levando à toxoplasmose congênita, com sequelas graves para o feto, como aborto, morte neonatal e anomalias fetais (Gagne 2001). Encefalite toxoplásmica e toxoplasmose disseminada têm sido observadas em indivíduos imunocomprometidos por transplante de órgãos ou medula, câncer, terapia imunossupressora, bem como em pacientes com AIDS, onde grave encefalite toxoplásmica ocorre em cerca de 40% dos casos (Luft 1989; Amassari et al 1996). Nestes indivíduos, o quadro de toxoplasmose aguda geralmente é resultado da reativação de uma infecção crônica (Porter & Sande 1992). No caso de uma primoinfecção em indivíduo imunocomprometido, a toxoplasmose geralmente apresenta-se sobre a forma de doença pulmonar e encefalite difusa (Luft 1989).

Os oocistos de *T. gondii* são liberados nas fezes de gatos domésticos e outros felinos, resultando em uma grande contaminação do ambiente (Jewell et al 1972; Dubey & Beattie 1988; Lukesová & Literák 1998; Ocholi et al 1989; Dubey & Odening 2001). Os gatos domésticos são provavelmente a maior fonte de contaminação pois são comuns e produzem um número enorme de oocistos que são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente (Dubey & Frenkel 1972; Dubey 2001).

Recentemente *T. gondii* tem sido encontrado em muitos mamíferos marinhos, sugerindo que a contaminação da água do mar por oocistos seja mais comum que o imaginado (Dubey et al. 2003c). Além disto, grandes surtos de toxoplasmose aguda como o ocorrido no Canadá em 1994 (Bowie et al. 1997) foram relacionados a contaminação da água por oocistos de *T. gondii*. Estes fatos proveram razões para se questionar e reavaliar não só o papel da água como mecanismo de infecção da toxoplasmose bem como também a verdadeira dimensão da contaminação ambiental por oocistos liberados não apenas pelos gatos domésticos como pelos felinos selvagens.

O estudo da contaminação ambiental por *T. gondii* é complexo, pois, embora os oocistos possam ser detectados por métodos de concentração nas fezes contaminadas (Ruiz & Frenkel 1980b), estes não podem ser distinguidos morfologicamente dos oocistos de pelo menos outros quatro coccídeos

(*Hammondia hammondi, H. heydorni, Neospora caninum, Besnoitia)***,** fazendo-se necessário o ensaio em camundongos para confirmação da espécie (Dubey 2004). Soma-se a isto, o fato de não existir até o momento técnica padronizada para detectar oocistos de *T. gondii* no ambiente (Dubey 2004). Métodos de Biologia Molecular têm sido sugeridos, embora a detecção do DNA não consiga distinguir entre oocistos viáveis e não viáveis, limitando sua utilidade. Villena et al (2004) encontraram DNA de *T. gondii* em 10 de 125 amostras ambientais mas nenhuma foi positiva no ensaio em camundongos.

Devido a todas estas dificuldades muitos trabalhos têm utilizado as aves como indicadoras da contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* devido a seus hábitos geofágicos. Neste ponto merece destaque a galinha criada livre, que pode dar valiosos indícios da contaminação ambiental, bem como, do seu papel como possível transmissora de *T. gondii* para o homem (Dubey et al 2005a).

Nesta década, Dubey e diversos colaboradores iniciaram um estudo mundial da estrutura populacional do *Toxoplasma* (Dubey et al 2005b), para isto, as galinhas criadas livres foram selecionadas para o bioensaio em camundongos, (Dubey 2005a).

Desta forma, os orgãos (coração e cérebro) das aves são processados e inoculados em grupos de camundongos objetivando o isolamento do parasito. A metodologia destes trabalhos propõe uma triagem sorológica prévia das aves com o MAT, o ponto de corte tem sido normalmente estabelecido em títulos de 1:5 ou 1:10, sendo a inoculação em camundongos feita apenas com material oriundo de galinhas positivas, Normalmente é feito um pool com os órgãos das galinhas negativas e este é servido como alimento para gatos livres de *Toxoplasma*, objetivando o encontro de oocistos nas fezes destes felinos. Em alguns casos foram recuperados oocistos de *T. gondii* das fezes destes gatos demonstrando a presença do parasita mesmo em aves com títulos considerados negativos (Dubey et al 2003b).Este fato deve-se muito provavelmente a grande sensibilidade dos felinos aos cistos teciduais de *T. gondii,* pois praticamente todos os gatos alimentados com cistos de toxoplasma acabam liberando oocistos nas fezes (Dubey & Frenkel 1976; Dubey et al 2005a).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Histórico

O *Toxoplasma* foi primeiramente descrito de forma independente por Alfonso Splendore, num coelho de laboratório em 1908 em São Paulo e por Nicolle e Manceaux 1908 num roedor norte africano chamado *Ctenodactylus gondii* em pesquisas desenvolvidas no Instituto Pasteur de Tunis. Na ocasião estes pesquisadores acharam tratar-se de um membro do gênero *Leishmania* e o batizaram de *Leishmania gondii*.

Nicolle e Manceaux 1909 caracterizaram o parasita como uma nova espécie batizando-o de *Toxoplasma gondii.* O nome *Toxoplasma* é derivado de sua forma crescente (toxon= arco e plasma= forma, em grego) e *gondii* deriva do nome do roedor onde primeiro foi identificado.

Janku 1923 na cidade de Praga foi o primeiro a descrever a toxoplasmose em humanos, ele fez a descrição de *Toxoplasma gondii* na retina de uma criança com 11 meses de idade com hidrocefalia e cegueira. Levaditi et al 1928 foram os primeiros a descrever os cistos teciduais como estágio persistente do parasito.

Pinkerton & Weinman 1940 foram os primeiros a relatar um caso de morte por toxoplasmose disseminada em um adulto humano.

Wolf et al 1937 e 1939, descreveram a doença congênita causada pelo *T. gondii,* enquanto que Pinkerton & Hendersen (1941) identificaram o parasita como causador de doença aguda e crônica em seres humanos. A hipótese de que o estágio infeccioso do protozoário é liberado no ambiente junto com as fezes dos gatos foi formulada por Hutchison 1965.

Luft et al 1984 publicaram o primeiro caso de toxoplasmose do sistema nervoso central num paciente com AIDS. Atualmente diversas vertentes da biologia do *Toxoplasma gondii* entre elas: a contaminação ambiental (principalmente o papel dos oocistos), a estrutura populacional do parasito, métodos diagnósticos que separem mais claramente infecções agudas de crônicas e novos medicamentos que possam ser efetivos na fase de cistos teciduais tem tido destaque, principalmente devido a crescente população de indivíduos imunossuprimidos infectados.

2.2 - Biologia do *T. gondii*

O *T. gondii* é um protozoário parasita que pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* e espécie única *Toxoplasma gondii* (Kawazoe 2003). Os coccídios em geral apresentam um ciclo de vida complexo, entretanto geralmente são hospedeiro-específico e com ciclo de transmissão unicamente fecal-oral, o *T. gondii* por sua vez, também pode ser transmitido por líquidos orgânicos, via transplacentária e por carnivorismo (Dubey 2004). O ciclo de vida pode ser dividido em duas fases: no hospedeiro intermediário ocorre apenas o ciclo assexuado da reprodução, enquanto que no hospedeiro definitivo (felinos)

primeiramente ocorre uma fase assexuada seguida posteriormente por uma fase sexuada de reprodução (kawazoe 2003).

2.2.1 - Ciclo no hospedeiro intermediário

Após a infecção com qualquer forma infectante do parasita, estes desenvolvem-se em taquizoítos, que dividem-se rapidamente por sucessivas endodiogenias dentro de diferentes células hospedeiras, o tempo de cada divisão é de seis a oito horas para uma cepa virulenta (Kasper & Boothroyd 1992). Quando o número de taquizoítos intracelulares aproxima-se de 64-128, a célula é rompida liberando os parasitas que passam a invadir as células adjacentes, esta fase é conhecida como fase aguda da infecção. Dentro de aproximadamente dez dias a maioria dos taquizoítos são destruídos pela resposta imunológica celular e humoral do hospedeiro. Os parasitos restantes da última geração iniciam então a formação de cistos teciduais que encerram formas parecidas com os taquizoítos, porém, de multiplicação lenta conhecidas como bradizoítos. Estes cistos teciduais podem permanecer viáveis por toda a vida do hospedeiro e possuem alta afinidade por tecidos nervosos e musculares (Dubey & Beattie 1988; Dubey 1993a; Dubey 1998 a; Tenter et al 2000).

2.2.2 - Ciclo no hospedeiro definitivo

Após a ingestão de cistos teciduais na carne, por membros da família felidae, a parede cística destes é digeridas pelas enzimas proteolíticas do estômago e intestino delgado, liberando os bradizoítos. Alguns penetram na lâmina própria intestinal e multiplicam-se como taquizoítos que farão o ciclo assexuado no hospedeiro definitivo, outros por sua vez, penetram nas células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento de numerosas gerações assexuadas chamadas esquizontes (Dubey & Frenkel 1972). Em seguida são formados gametas masculinos (microgametas, móveis, biflagelados) e femininos (macrogametas, imóveis), após a fertilização dos macrogametas pelos

microgametas, inicia-se a formação da parede do oocisto ao redor do gameta fertilizado. Quando o oocisto está maduro, é liberado no lúmen intestinal, via ruptura das células do epitélio. Posteriormente o oocisto é liberado nas fezes ainda não esporulado, sofrendo o processo de esporulação no meio externo dentro de 1-5 dias dependendo das condições ambientais (Dubey 1998a; Dubey 2004).

Além da ingestão de cistos teciduais, os felinos também podem infectar-se através de taquizoítos e oocistos presentes no ambiente (alimentos e água), entretanto, estas vias parecem ser menos eficientes. Experimentos realizados com infecção experimental de gatos mostraram que praticamente todos os animais infectados com cistos teciduais (bradizoítos) liberam oocistos nas fezes, enquanto que menos de 30% dos animais infectados com oocistos ou taquizoítos liberam oocistos nas fezes (Dubey & Frenkel 1972).

2.2.3 - Formas infectantes

O *T. gondii* apresenta três formas infectantes: taquizoítos (formas livres), bradizoítos (nos cistos teciduais) e esporozoítos (nos oocistos).

Taquizoítos

É o estágio de multiplicação rápida do parasita, apresenta formato crescente ou semioval, mede entre 4-8 µm de comprimento e 2-4 µm de largura, possuindo um núcleo central e poucos ou nenhum grânulos PAS-positivos (Ácido Periódico De Schiff) (Dubey 1998a). Os taquizoítos são capazes de infectar todos os tipos de célula nucleada, invadindo-as por penetração ativa e formando um vacúolo citoplasmático denominado vacúolo parasitóforo. Após a invasão celular, os taquizoítos sofrem sucessivas replicações, quando então rompem a célula e são disseminados via corrente sanguínea invadindo outras células. Este processo leva a uma forte reação inflamatória e destruição tecidual, causando as manifestações clínicas da toxoplasmose, sendo característico da fase aguda da doença (Montoya & Liesenfield 2004). Por outro lado, são as formas menos

resistentes do parasito, sendo facilmente destruídos pelas condições ambientais, pelo suco gástrico, pela desidratação e por variações osmóticas. Por estímulo do sistema imune, os taquizoítos transformam-se em bradizoítos dentro de cistos teciduais.

Bradizoítos

Os bradizoítos são morfologicamente muito semelhantes aos taquizoítos, porém apresentam um núcleo terminal e vários grânulos PAS-positivos, além de possuírem metabolismo e reprodução mais lento e expressarem moléculas estágio-específicas, sendo também menos suscetíveis a destruição por enzimas proteolíticas (Dubey 2004).

Os bradizoítos estão encerrados em cistos teciduais, estes medem de 5 a 70 µm de comprimento, com uma membrana dupla elástica, podendo conter de centenas à milhares de bradizoítos. Os cistos podem ser formados em praticamente todos os órgãos, incluindo rim, fígado e pulmões, porém, parecem demonstrar predileção para tecidos nervosos e musculares, incluindo o cérebro, olhos, musculatura esquelética e cardíaca (Dubey et al 1998). Os cistos teciduais apresentam boa resistência as variações de temperatura, sendo mortos por cozimento a 55°C em 30 minutos (Dubey et al 1970) e congelamento a -20°C (Frenkel et al 1975). Entretanto, em carnes estocadas a temperaturas entre 4°c e 6°c, os cistos permanecem viáveis por mais de 2 meses (Jacobs et al 1960).

Modelos experimentais demonstram que cistos teciduais são formados entre 5 e 6 dias pós- infecção oral com bradizoítos em camundongos (Dubey 1997) e entre 6 e 7 dias pós infecção oral com oocistos (Dubey et al 1997).

Esporozoítos

Como resultado da fase sexuada da reprodução do *T. gondii* no epitélio intestinal dos felinos, ocorre a formação de oocistos, que são estruturas de formato sub-esférico ou esférico, com diâmetro aproximado de 12 µm e dupla membrana, sendo a forma de resistência ambiental. Dubey & Frenkel (1972), estimam que um único gato possa liberar milhões de oocistos não esporulados

(não infectantes) nas fezes diariamente. Esta liberação tem início entre 5 e 10 dias após a infecção inicial. A esporulação dos oocistos ocorre no ambiente entre 1 e 5 dias após a liberação nas fezes. Cada oocistos esporulado contém 2 esporocistos elipsóides e dentro de cada um destes existem quatro esporozoítos, que são formas infectantes medindo 2 µm de largura por 6 µm de comprimento (Dubey 1998a).

Após a ingestão de oocistos esporulados, os esporozoítos abandonam este e invadem as células do epitélio intestinal, dentro de quatro horas já é possível observar esporozoítos no sangue periférico (Dubey, 1997; Speer & Dubey; 1998).

Estudos em laboratório mostram que os oocistos são muito resistentes as variações ambientais, podendo suportar temperaturas de -21°C por no mínimo 28 dias, 30°C por 107 dias, 40°C por 24 horas e 50°C por uma hora (Frenkel & Dubey 1972; Dubey 1998a; Dubey et al 1970). Em condições naturais, por sua vez, Frenkel et al 1975 obtiveram oocistos viáveis de fezes que foram expostas a temperaturas que variaram entre -20°C a 35°C num período de 548 dias no Kansas, USA. Os oocistos também são muito resistentes aos desinfetantes normalmente usados, permanecendo viáveis mesmo após a exposição a formalina 10% por 48 horas; ácido sulfúrico+ dicromato (63%-7%) por 30 minutos; etanol+ácido acético (95%-5%) por uma hora; lauril sulfato de sódio (0.1%) por 24 horas e amônia líquida (5.5%) por uma hora (Ito et al 1975; Dubey et al 1970; Frenkel & Dubey 1972).

2.2.4 - Cepas de *T. gondii*

Um dos fatos mais interessantes na biologia do *T. gondii* é a sua estrutura populacional, apesar da presença de um ciclo sexual que ocorre em felinos, a população do parasito apresenta-se primariamente clonal, existindo três linhagens que embora distintas, estão fortemente relacionadas (Darde´ et al 1992; Sibley & Boothroyd 1992; Howe & Sibley 1995).

Estas linhagens são denominadas de tipo I, II e III e apresentam uma variação menor que 2% em seu genoma (Grigg et al 2001). Existe uma marcada

diferença entre a letalidade para camundongos entre as três linhagens, a do tipo I possui dose letal absoluta (LD_{100}) com um único parasito viável, sendo chamada de linhagem virulenta, enquanto que as linhagens II e III possuem dose letal de 50% (LD_{50}) em inóculos iguais ou maiores que mil parasitos, provocando facilmente infecção crônica. Estas linhagens são designadas como avirulentas (Howe et al 1996). Existem muitas explicações possíveis para a estrutura populacional clonal do *T. gondii,* em primeiro lugar, o parasito pode ser transmitido entre hospedeiros intermediários, através do carnivorismo e necrofagia, não passando pelo ciclo sexual no hospedeiro definitivo (Howe & Sibley 1995; Su et al 2003). Em segundo lugar, muitos macrogametas não fertilizados permanecem viáveis no hospedeiro definitivo, podendo formar oocistos por partenogênese (Ferguson 2002). Em terceiro lugar, é provavelmente raro o encontro de felinos naturalmente infectados simultaneamente por duas diferentes linhagens de *T. gondii* (Boothroyd & Grigg 2002).

A alta virulência da linhagem do tipo I, foi primeiramente explicada, como sendo resultado das sucessivas passagens entre hospedeiros ou talvez resultado de condições ambientais. Este ponto de vista foi reforçado pelo isolamento precoce da cepa RH em 1939 por Sabin. Esta cepa é característica do tipo I, sendo letal para camundongos mesmo em baixos inóculos. Após o isolamento, a cepa RH foi distribuída para vários laboratórios e usada por vários grupos de pesquisa, desta maneira sofreu diversas passagens em camundongos, teoricamente aumentando sua virulência. Atualmente, entretanto considera-se o caráter virulento das cepas do tipo I como resultado primário do genótipo. Vinte isolados de *T. gondii* foram caracterizados como pertencentes ao tipo I e todos compartilhavam o fenótipo de alta virulência para camundongos, indicando que esta possui estrita correlação com o genótipo do parasita (Sibley & Boothroyd 1992).

Na tentativa de mapear os genes responsáveis pela virulência das cepas do tipo I, foi realizado o cruzamento genético entre uma cepa deste grupo com uma do tipo III (avirulenta), a F1 resultante foi então utilizada em inoculações com camundongos e posteriormente genotipada usando-se uma combinação de

aproximadamente 70 marcadores de DNA que em seguida foram analisados por técnicas moleculares. Como resultado, obteve-se que a virulência aguda é um caráter multigênico, sendo o ponto chave um lócus no cromossomo VII. Sugere-se que apenas este lócus possa contribuir com cerca de 50% do traço de virulência das cepas do tipo I (Su et al. 2002). Cepas do
tipo I são letais independente da via de inoculação e dosagem, contrariamente, a letalidade das cepas do tipo II e III está diretamente ligada a via de inoculação, dosagem e genótipo do hospedeiro (Sibley 2003).

Embora existam diferenças, a letalidade das cepas do tipo I, não pode ser atribuída a maior taxa de multiplicação, velocidade de disseminação tecidual ou número de parasitas nos tecidos. Em vez disto, a patogênese parece ocorrer devido a presença ou indução de mediadores inflamatórios solúveis (Sibley 2003). Embora existam dramáticas diferenças entre infecções com cepas do tipo I e cepas do tipo II ou III em camundongos, não existem garantias que estas diferenças sejam observadas em outros hospedeiros (Boothroyd & Grigg 2002).

Diversos estudos tem mostrado a predominância de cepas do tipo II em pacientes imunossuprimidos (principalmente portadores de AIDS) e infecções congênitas. Em estudo de coorte realizado na França com pacientes imunossuprimidos, cerca de 75%-80% dos pacientes apresentavam cepas do tipo II (Honore et al 2000). Em outro estudo Francês, as cepas do tipo II foram novamente predominantes, dos 45 pacientes portadores de AIDS com infecção toxoplásmica, 34 apresentavam cepas tipo II (Howe et al 1997). Estudos realizados nos USA, dão suporte a idéia que cepas do tipo II são predominantes também em casos de toxoplasmose congênita (Howe & Sibley 1995). Cepas do tipo III são pouco comuns em seres humanos, sendo isoladas principalmente de animais (Montoya & Liesenfield, 2004).

Cepas do tipo I têm sido encontradas em casos de toxoplasmose ocular não usual, onde ocorre grande destruição tecidual e pouca resposta ao tratamento quimioterápico (Boothroyd & Grigg 2002). De fato, em surtos de toxoplasmose ocular no Canadá e no Brasil, cepas do tipo I foram isoladas dos casos mais graves, enquanto nenhuma cepa dos tipos II e III foi obtida (Burnett et al 1998).

Embora 95%-98% das cepas de *T. gondii* isoladas de humanos e outros animais pertençam aos tipos I, II ou III, existe um grupo de cepas que não se enquadram em nenhum destes grupos, sendo conhecidas como recombinantes ou atípicas. A existência deste grupo de cepas, sugere a recombinação natural entre cepas de *T. gondii,* embora seja muito raro o encontro de hospedeiros infectados com mais de um tipo de cepa (Howe & Sibley 1995). As cepas atípicas são mais comumente encontradas em casos de toxoplasmose ocular severa (Boothroyd & Grigg, 2002).

2.3 - Aspectos Epidemiológicos

Inquéritos soroepidemiológicos realizados em diferentes regiões do mundo tem demonstrado que a toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns mundialmente. Atualmente estima-se que um terço da população do planeta tenha tido contato com o parasita (Tenter et al 2000).

Desde a introdução do Dye Test em 1948 por Sabin e Feldman, diversos estudos soroepidemiológicos tanto em seres humanos como em diversas espécies animais tem provido evidências da larga distribuição e grande prevalência da infecção por *T. gondii* no mundo, entretanto esta soroprevalência varia grandemente entre diferentes países ou até mesmo entre áreas de um mesmo país. Variações também são encontradas entre grupos étnicos, faixa etária e principalmente hábitos alimentares e de higiene das populações, fato que reforça a idéia de que a via oral é a principal fonte de contaminação (Desmonts et al 1965; Remington et al 2001).

No entanto, devemos ser cuidadosos ao compararmos informações sobre soroprevalência da infecção, pois os estudos realizados, muitas vezes utilizam métodos diferentes para detecção de anticorpos e estes testes variam muito quanto a sensibilidade, especificidade e valores preditivos, como conseqüência, dois testes geralmente não produzem o mesmo resultado, mesmo que realizados no mesmo laboratório (Fleck, 1989; Petithory et al 1996).

Embora dados soroepidemiológicos possam não refletir a verdadeira prevalência da infecção por *T. gondii* nas diversas populações, tornam-se importantes se interpretados como estimativas ou como meio de comparação de prevalência entre populações similares (Tenter et al 2000). Por exemplo, na década de 90, a soroprevalência da infecção por *T. gondii* nos países da Europa Central, como Áustria, Bélgica, França, Alemanha, e Suíça foi estimada em taxas entre 37% e 58% em mulheres em idade fértil. Soroprevalência comparável foi encontrada em populações similares na Croácia, Polônia, Eslovênia e Austrália. Soroprevalência sensivelmente maior foi encontrada em países da América latina, como Argentina, Brasil, Cuba, Jamaica e Venezuela (54%-72%). Em contraste, baixa prevalência foi encontrada no sudeste asiático, como China e Coréia (4%-39%), sendo pequena também em áreas com clima frio como os paises escandinavos (11%-28%) (Tenter et al 2000).

2.3.1 - Soroprevalência em seres humanos

Devido a sua importância como doença congênita, a maioria dos inquéritos epidemiológicos sobre a infecção por *T. gondii* em seres humanos, são realizados em mulheres em idade fértil. Deve-se ter atenção no entanto que infelizmente, os estudos feitos até o momento usaram diferentes tipos de teste para detecção de anticorpos antitoxoplasma, apresentando também variação quanto ao número de amostras utilizadas. Desta maneira em um único país, as taxas obtidas variam enormemente, como por exemplo, na Alemanha, onde um estudo realizado em 1992 com 5670 mulheres encontrou uma taxa de infecção de 39% utilizando o ensaio de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA) como teste padrão (Beringer 1992), enquanto que um outro estudo feito de 1987 até 1990 com 4355 mulheres encontrou taxa de infecção de 73% utilizando o ensaio enzimático de imunoabsorção (Elisa) como teste padrão (Kraube et al 1993).

Na Europa, estudos realizados durante a década de 90 encontraram taxas de infecção de 50% na Bélgica; 28% na Dinamarca; 20% na Finlândia; 37% na Grécia; 23% na Itália; 59% na Polônia; 14% na Suécia; 42% na Espanha; 71% na

França e 10% no Reino Unido (Tenter et al 2000). Na Ásia, no mesmo período, foram encontradas taxas de 38% em Bangladesh; 8% na Índia; 7% na Coréia; 55% no Nepal e 13% na Tailândia (Tenter et al 2000). As taxas encontradas no Continente Africano foram de 43% no Egito; 20% na Etiópia; 71% no Gabão; 84% em Madagascar; 78% na Nigéria e 60% no Congo (Tenter et al 2000).
Nas Américas as taxas foram de 59% na Argentina; 60% na Colômbia; 51% em Cuba; 54% na Venezuela e 35% no México (Tenter et al 2000).

No Brasil, também durante a década de 90, foram realizados vários estudos onde encontraram taxas de soro positividade de 54% em Porto Alegre (Neves et al 1994); 65% em São Paulo (Inagaki 1997) e 69% em Recife (Nóbrega 1998). Na cidade de Goiânia, em estudo realizado no hospital das clínicas da Universidade Federal de Goiás, foi descrita taxa de soropositividade variando entre 48,6% e 56,7%, neste trabalho foram amostrados pacientes oriundos de diversos setores do hospital (Fernandes & Barbosa 1972).

2.3.2- Soroprevalência em animais

Além do ser humano, diversos outros animais domésticos e selvagens, têm sido alvo de estudos sorológicos para determinar a infecção por *T. gondii.* Muitos destes estudos tentam inferir a importância destes animais como fonte de infecção para o homem, visto que a maioria é utilizada como alimento. Da mesma forma que em inquéritos realizados em seres humanos, as diferentes amostragens e os variados tipos de testes sorológicos empregados, são agentes dificultadores da interpretação e comparação dos resultados. Em gado, foram encontradas taxas de positividade de 69% na França; 40% na Grécia; 5% na Noruega; 43% em Portugal; 40% na Espanha; 92% na Itália; 26% em Bangladesh; 1% na China ; 9% na índia; 49% no Egito; 39% na Argentina e 32% no Brasil (Tenter et al 2000)

Durante muitos anos, os porcos foram considerados as principais fontes de infecção de *T. gondii* para o homem nos Estados Unidos e na Europa, este fato deve-se as altas taxas de soropositividade e ao isolamento do parasito na carne destes animais (Janitschke 1999; Shirley 1997; Dubey 1994). No entanto, o

desenvolvimento de melhores técnicas de produção e manejo em fazendas de engorda e abate de suínos, em muitos países europeus e nos Estados Unidos, resultou em um decréscimo significativo da soropositividade. A Alemanha é um bom exemplo desta tendência, pois um estudo realizado em 1962 em fazendas de engorda e abate de suínos encontrou taxas de soro positividade de até 97% (Boch et al 1964). Em contraponto, um estudo realizado de 1993-1995, após a implantação de técnicas de manejo intensivo nas fazendas, encontrou taxas de soropositividade menores que 1% (Seineke 1996). A Holanda é outro exemplo, pois um estudo realizado em 1969 também em fazendas de engorda e abate de suínos encontrou taxa de soro positividade de 54% (Cremers 1969), após a implantação do manejo intensivo, a taxa caiu para menos de 2%, como revelou um estudo feito em 1995 (Van Knapen et al 1995).

No entanto, os suínos continuam a ter papel importante na transmissão da toxoplasmose, pois em muitos países, poucas ou nenhuma são as fazendas com manejo intensivo do rebanho. Soma-se a isto o fato que mesmo nos países onde tal manejo foi implantado, existem ainda muitas pequenas propriedades que engordam e abatem os animais da maneira tradicional, posteriormente vendendo a carne para a população. Estudos realizados durante a década de 90 encontraram taxas de soropositividade em suínos de 43% na Argentina; 9% no Canadá e 64% na Itália (Tenter et al 2000). Nos Estados Unidos às taxas variaram de 1% na Carolina do Norte até 22% em Iowa (Tenter et al 2000). No Brasil, Guimarães et al 1992 encontraram taxas de soro positividade de 90% em suínos da raça piau e Araújo & Souza 1997 encontraram taxas de até 54% na região de Erechim, no estado do rio grande do sul.

Animais que pastam estão inevitavelmente em risco de adquirir a infecção por *T. gondii,* pois estão mais expostos a contaminação ambiental por oocistos, neste quesito cabras e ovelhas assumem papel importante como fontes de infecção, visto que a soroprevalência nestes animais é alta (Tenter et al 2000). Em ovelhas a positividade pode chegar a 92% (Cabannes et al 1997) enquanto que em cabras pode alcançar até 75% do rebanho (Roger et al 1991). Estes dados tornam-se particularmente importantes devido ao encontro de cistos de *T. gondii* em variados pedaços de carne de ovelha e ao encontro de taquizoítos em leite de

cabra (Dubey & Kirkbride 1989; Lundén & Uggla 1992; Sacks et al 1982). Animais selvagens também tem sido alvo de estudos sorológicos para determinar o grau de infecção por *T. gondii*, tendo especial importância aqueles que são usados como alimento por caçadores e suas famílias. Em veados foi encontrada uma taxa de 27% de positividade no Brasil; até 100% na República Tcheca; 44% no Alabama (USA) e 60% na Pensilvânia (USA) (Tenter et al 2000). Em gansos, a taxa variou de 4% na Turquia até 50% no Iran, em perus a taxa variou entre 71% no Alabama e 10% na Virgínia Leste (Tenter et al 2000). Em ursos a variação ficou entre 15% no Alaska e 84% na Carolina do Norte (Tenter et al 2000). Tanto o consumo destas carnes quanto sua manipulação são fontes de contaminação para o homem, como visto num surto de toxoplasmose congênita ocorrido no norte de Quebec (Canadá), que foi atribuído ao hábito das mulheres grávidas de retirar a pele de animais selvagens (lobos, raposas) para usar como agasalhos (Mcdonald et al 1990).

Outro animal que parecer ter participação importante na epidemiologia da toxoplasmose é o cão, sendo também comuns os inquéritos soroepidemiológicos nesta espécie. Embora o consumo de carne de cachorro seja comum em algumas culturas, o principal papel destes animais na transmissão do *T. gondii* é aparentemente o de veiculadores de oocistos. Desta maneira o animal ao se deitar ou rolar em áreas contaminadas com oocistos, levaria estes presos em seu pêlo, permitindo a infecção principalmente de crianças, que possuem o hábito de acariciar os animais e depois levarem as mãos à boca (Frenkel et al 1995; Lindsay et al 1997). Em estudos realizados durante a década de 90 foi encontrada uma taxa de soropositividade em cães de 60% na Argentina; 39% na França; 17% na Itália e 8% em Taiwan. No Brasil as taxas variaram entre 46% e 84% (Tenter et al 2000).

Os felinos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii,* podendo cada animal liberar milhões de oocistos nas fezes diariamente, por isso os felinos e principalmente os gatos são objeto de estudos sorológicos para detectar a presença de anticorpos antitoxoplasma. Devido às dificuldades de isolamento de oocistos das fezes, os inquéritos baseados na presença de anticorpos são

epidemiologicamente mais satisfatórios, visto que, um gato soropositivo provavelmente já eliminou oocistos em algum momento da vida (Dubey & Frenkel 1972). Devido aos hábitos higiênicos e alimentares, são encontradas diferenças consideráveis na positividade entre gatos domésticos e vadios. No Brasil, por exemplo foi encontrada uma taxa de soropositvidade de 18% em gatos domésticos (Lucas et al 1999) e 73% em gatos vadios (Garcia et al 1998). Em recente estudo, Penna et al 2005 analisaram 237 gatos vadios de 15 municípios do estado de São Paulo e encontraram soropositividade de 35,4%, porém oocistos só foram isolados nas fezes de 1,3% desses animais.

2.3.3 - Fontes de infecção

Durante muito tempo, os cistos teciduais contidos na carne de diversos animais, principalmente de porcos foi considerada a maior fonte de infecção por *T. gondii* para o homem (Mcallister 2005). Porém recentes surtos de toxoplasmose relacionados com a contaminação da água por oocistos, bem como numerosos trabalhos demonstrando a infecção em mamíferos marinhos como golfinhos, focas, lontras e baleias (Dubey et al 2003b) têm dado subsídios para a mudança deste conceito. Um caso bem acompanhado foi o surto ocorrido numa cidade do Canadá, onde entre 2894 e 7718 pessoas adquiriram infecção por *T. gondii.* Destas, 100 apresentaram sintomas de toxoplasmose aguda, sendo que 20 indivíduos apresentaram toxoplasmose ocular, 8 tiveram sintomas de toxoplasmose generalizada como suor noturno, calafrios e dor de cabeça, outros 51 indivíduos apresentaram aumento dos linfonodos. A faixa etária dos doentes variou entre 6 e 83 anos. Durante exames pré-natais, 37 mulheres foram identificadas como portadoras de primoinfecção e um total de 12 crianças nasceram portadoras de toxoplasmose congênita. Embora oocistos não tenham sido identificados no reservatório de água municipal, a contaminação deste com fezes de gatos domésticos e leões da montanha foi a provável fonte de infecção (Isaac-Renton et al 1998; Aramini et al 1998, 1999).

Como os mamíferos marinhos tornam-se infectados ainda é desconhecido, a ingestão de oocisto direto da água do mar ou de animais contaminados com estes são as formas mais prováveis (Dubey 2004). Miller et al 2002 apresentou evidências de que os fluxos d'água doce contaminados com fezes de felinos próximos as regiões costeiras, possam apresentar-se como fonte de contaminação da água do mar, ao carrearem oocistos para esta. Os oocistos de *T. gondii* podem esporular e manter-se viáveis na água do mar por muitos meses (Lindsay et al 2003). Novos estudos também sugerem papel importante dos invertebrados marinhos filtradores; Lindsay et al 2004 contaminaram com oocistos de *T. gondii* um tanque com ostras e 21 dias depois recuperaram oocistos viáveis nos tecidos destas, obtendo taquizoítos, após a inoculação em camundongos. As coleções d`agua doce, também podem estar diretamente ligadas a transmissão de T. Gondii para o homem via oocistos, por exemplo, Bahia-Oliveira et al 2003 investigando um surto de toxoplasmose em Campos dos Goytacazes, cidade do norte do estado do Rio de Janeiro, sugeriram a ingestão de oocistos pelo consumo de água não tratada de rios, lagos ou poços como a principal via de contaminação por *T. gondii* naquela cidade.

As altas taxas de soroprevalência em grupos de vegetarianos restritos também podem ser explicadas pela contaminação tanto da água quanto dos alimentos, até mesmo vegetais, com oocistos de *T. gondii* (Hall et al 1999).

Apesar do surgimento de uma nova visão quanto à importância do oocisto presente na água e nos alimentos, como fonte de infecção para o homem (Dubey, 2004; Mcallister 2005), os cistos teciduais ainda tem importante papel na transmissão da toxoplasmose para o ser humano. Um estudo multicêntrico europeu que incluiu cidades selecionadas na Bélgica, Dinamarca, Itália, Noruega, Suíça e Reino Unido, atribuiu 30%-63% dos casos de infecção humana por *T. gondii* ao consumo de carne mal cozida ou curada (Cook et al 2000). Resultado semelhante foi encontrado numa população similar na Polônia (Paul 1998). Estudos de caso controle, desenvolvidos na França, Iugoslávia e USA também associaram o consumo de carne crua ou mal cozida à infecção por *T. gondii* (Tenter et al 2000).

Embora o consumo de carne crua ou mal cozida tenha sido consistentemente identificado como fator de risco para infecção por *T. gondii,* a sua importância relativa e o tipo de carne predominantemente envolvida variou muito de uma região para outra. Na França o consumo de carne bovina foi um fator de risco mais forte que o consumo de cordeiros (Baril et al 1999), por outro lado, na Noruega o consumo de cordeiro mostrou-se um fator de risco maior que o consumo de carne suína (Kapperud et al 1996). Contrariamente, na Polônia a carne suína foi o principal fator de risco (Cook et al 2000). Provavelmente, estes resultados refletem não apenas os hábitos alimentares da população como também as diferentes prevalências da infecção nos diferentes rebanhos (Tenter et al 2000). Possuem também importante papel na transmissão da toxoplasmose, o hábito de experimentar o alimento durante o preparo e o uso de utensílios domésticos como facas e colheres sem a devida higienização com água quente ou sabão (Dubey 1998a).

Além da via transplacentária, dos oocistos no ambiente e dos cistos teciduais, a transmissão do *T. gondii,* também pode ocorrer por outras vias tais como: transplantes de órgãos (Montoya & Liesenfield 2004), taquizoítos no leite e saliva, deposição de taquizoítos na mucosa vaginal junto com o esperma e acidentes de laboratório (Kawazoe 2003). O leite não pasteurizado pode ser uma importante fonte de infecção toxoplásmica para o homem, desta forma, a mãe pode transmitir taquizoítos para a criança durante a amamentação (Kawazoe 2003). Além disto, o leite de outros animais (principalmente cabras) tem sido relacionado a casos de toxoplasmose (Lundén & Uggla 1992).

2.3.4 – Toxoplasmose em aves

Durante muito tempo, a maioria dos relatos de infecção natural por *T. gondii*, foi feita em aves selvagens, abrangendo as mais diferentes famílias, como por exemplo, Columbiformes (Frenkel et al 1995; Literak et al 1992), Passeriformes (Literak et al 1992; Ruiz & Frenkel 1980a) e Galiformes (Lindsay et al 1994; Literak et al 1992).

Diversos estudos foram também realizados para determinar a prevalência sorológica da infecção por *T. gondii* em diferentes espécies de aves, devendo-se no entanto ter cautela na interpretação dos resultados destes estudos, visto que nem todos os testes sorológicos usados em mamíferos funcionam em aves (Dubey 2002). Um bom exemplo é o Sabin-Feldman Dye Test, que pode detectar anticorpos no soro de pombos, porém é ineficiente na detecção de anticorpos em pardais e galinhas (Dubey 2002). Ruiz & Frenkel 1980a conseguiram isolar *Toxoplasma* viável de pardais sem anticorpos detectáveis pelo Dye Test. Atualmente dentre os testes sorológicos mais utilizados para o estudo em aves estão o teste de aglutinação em látex (LAT), o teste de hemaglutinação direta (IHAT), o teste de aglutinação modificado (MAT), o Elisa e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Dubey 2002). O MAT mostrou-se mais eficiente que o LAT e o IHAT, pois detectou anticorpos mais cedo e em títulos maiores (Dubey et al 1993, 1994ab, 1995). O Elisa mostrou-se eficiente na detecção de anticorpos no soro de perus e galinhas (Dubey et al 1993a), porém não foi testado em outras espécies. A RIFI mostrou-se eficiente para testes em soro de galináceos (Sedlák et al 2000).

Estudos utilizando infecções experimentais demonstraram que a susceptibilidade a infecção toxoplásmica parece ser diferente nas diversas espécies de aves. Perdizes e pombos mostram-se muito susceptíveis a infecção (Sedlák et al 2000; Dubey 2002), enquanto que perus domésticos mostraram-se resistentes, mesmo quando infectados com milhões de taquizoítos da cepa virulenta RH (Drobeck et al 1953).

Os sinais clínicos da toxoplasmose naturalmente adquirida em aves são também muito variáveis, existem trabalhos reportando anorexia, febre alta, convulsões, lesões necróticas no baço e pulmões e lesões oculares (Vickers et al 1992; Cassamagnaghi et al 1977; Johnson 1943). No que tange as galinhas especificamente, a infecção por *T. gondii* é geralmente subclínica, raramente apresentando sintomas (Miller et al 1972). Porém, em alguns casos como, por exemplo, o estresse causado pelo cativeiro (Parenti et al 1986) os sintomas de toxoplasmose aguda podem surgir, entre eles, os mais comuns são anorexia, perda de peso e cegueira (Da Silva 2003). Kaneto et al 1997 alerta para a real

possibilidade de transmissão do *T. gondii* para o homem através de cistos presentes no coração e músculos esqueléticos destas aves, principalmente devido ao fato de raramente estas apresentarem sintomas clínicos da doença.

Diversos órgãos das galinhas são infectados com o *T. gondii*, tendo sido encontrados parasitos, nos olhos, baço, rins, fígado e pulmões (Da Silva 2003). Porém, Dubey 1981 demonstrou que o *T. gondii* apresenta um tropismo maior para células do cérebro, coração e ovários das galinhas.

Nesta década, Dubey e diversos colaboradores iniciaram um estudo mundial da estrutura populacional do toxoplasma (Dubey et al 2005b). Para isto, as galinhas criadas livres com fins comerciais foram escolhidas como indicadoras da contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* (Dubey et al 2005a).

Estas aves, no Brasil popularmente conhecidas como “galinhas caipiras”, assumem papel importante como indicadoras da contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* devido a seu hábito geofágico de alimentação (Dubey et al 2003a b).

2.4 – Lesões ocasionadas pela toxoplasmose

O tamanho do inóculo, a virulência da cepa, a via de infecção e a espécie hospedeira parecem afetar diretamente o rumo da infecção toxoplásmica em seres humanos e demais animais (Montoya & Liesenfield 2004). Os processos patológicos e os sinais clínicos da toxoplasmose podem ser separados conforme o status do hospedeiro:

2.4.1 - Toxoplasmose em hospedeiro imunocompetente

Cerca de 90% dos casos de infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes (incluindo crianças e mulheres grávidas) são assintomáticos, em 10% dos casos surgem sintomas pouco específicos que raramente necessitam de tratamento (Montoya & Liesenfield 2004). O sintoma mais comum é a linfadenite que pode ser regional ou generalizada, os taquizoítos após a

reprodução intracelular rompem a célula hospedeira causando necrose e os gânglios linfáticos apresentam-se aumentados e dolorosos. Paralelamente podem surgir episódios de febre acompanhados ou não de exantema que geralmente possuem curso benigno (Frenkel 1996; kawazoe 2003).

Como a infecção é usualmente contraída por via oral, pode-se suspeitar de uma fase entérica, mais tarde o parasito dissemina-se por via linfática e sanguínea podendo alcançar órgãos como o fígado, pulmões e coração. A destruição das células destes órgãos pelos taquizoítos pode gerar hepatite, pneumonia e miocardite respectivamente, entretanto estas apresentações são muito raras. A hepatite deve-se a necrose focal , sendo discreta e de curta duração, a cicatrização não acarreta seqüelas (Vischer et al 1967); a pneumonia é difusa com expectoração escassa contendo mononucleares (Ludlam & Beattie 1963); a miocardite inicial é fruto da destruição tecidual provocada pelos taquizoítos, posteriormente são formados cistos que ao se romperem geram sintomas de hipersensibilidade (Jones et al 1969; Theologides & Kennedy 1969). Entre 2% a 3% dos pacientes que adquirem infecção toxoplásmica surgem sintomas de toxoplasmose ocular (Perkins 1973).

Durante muito tempo a toxoplasmose ocular foi considerada oriunda da reativação de casos crônicos, entretanto estudos recentes tem demonstrado que as lesões oculares podem surgir também como resultado de primoinfecção em indivíduos saudáveis (Couvreur & Thulliez 1996). Acredita-se que a corrente sanguínea é a via de infecção. Os capilares levam os taquizoítos livres ou dentro de leucócitos até a região da retina, onde estes começaram a invadir as células adjacentes ao vaso, rompendo-as em seguida ocasionando destruição tecidual (Roberts & McLeod 1999).

A retinocoroidite é a lesão mais freqüente, consistindo em um foco de necrose coagulativa bem definido na retina, as lesões são branco-amareladas, circunscritas por hiperemia, apresentando bordas borradas devido à inflamação no vítreo (Frenkel 1996; Roberts & McLeod 1999). As lesões podem evoluir para perda parcial da visão, cegueira total ou então curar por cicatrização. Neste caso,

as cicatrizes apresentam-se com bordas hiperpigmentadas como resultado da ruptura do epitélio da retina.

Após a fase aguda da infecção, o *T. gondii* forma cistos teciduais que podem permanecer viáveis por toda a vida do hospedeiro e em determinadas circunstâncias (principalmente imunossupressão), liberarem bradizoítas que recomeçam o processo de destruição tecidual da retina (Frenkel 1996; kawazoe 2003).

2.4.2- Toxoplasmose em hospedeiro imunossuprimido

Contrastando com o curso geralmente favorável da toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes, a infecção em pacientes imunossuprimidos pode ser fatal. A toxoplasmose é a causa primária da morte de cerca de 10%-30% dos pacientes com AIDS. Infecções por *T. gondii* tem sido relatada também em pacientes transplantados que receberam coração (Anthuber et al 1991), rim (Renoult et al 1991), fígado (Kusne et al 1986) e medula óssea (Derouin et al 1992).

O sistema nervoso central é o local mais tipicamente atingido pela infecção no grupo de indivíduos imunossuprimidos (Montoya & Liesenfield 2004). Entre os principais sintomas desta infecção encontram-se febre, dores de cabeça, tontura, paralisias focais, convulsões e coma (Remington 1974). A encefalite toxoplásmica atinge cerca de 40% dos pacientes com AIDS, possuindo lesões focais com centro de necrose coagulativa. Existem também diversos relatos de pacientes transplantados que apresentaram quadro de encefalite toxoplásmica (Dietrich et al 2000). A retinocoroidite em pacientes imunossuprimidos apresenta-se de forma mais dramática, estando presente uma necrose difusa da retina associada com leve inflamação e grande número de parasitos (Roberts & McLeod 1999).

Além dos pacientes com AIDS e transplantados outras situações de imunossupressão facilitam a instalação de casos graves de toxoplasmose, entre elas, o uso de medicação imunossupressora, radioterapia e a doença de hodgkins (Frenkel, 1996). Após a introdução da HAART (Terapia Anti Retroviral Altamente Ativa) para os pacientes com AIDS o número de casos de encefalite toxoplásmica

neste grupo vem declinando em diversos países. Paralelamente, estudos indicam que o uso da combinação de pirimetamina e sulfadiazina pode ser eficaz para prevenir uma possível reativação de toxoplasmose crônica em indivíduos imunossuprimidos. Em alguns casos, é necessário o uso da medicação por toda a vida do paciente (Tenter et al 2000; Montoya & Liesenfield 2004).

2.4.3 - Toxoplasmose congênita

Atualmente, estima-se que os casos de toxoplasmose congênita variam de um a dez por 10.000 nascimentos dependendo do país (Guerina et al 1994; Lebech et al 1999), contudo, a transmissão vertical do *T. gondii* está diretamente ligada ao momento gestacional em que a infecção materna foi adquirida. Quanto mais tarde ocorrer a infecção maior o risco do feto ser atingido. O risco de transmissão para o feto é de menos de 2% se a infecção materna for adquirida nas primeiras seis semanas de gestação, elevando-se para mais de 90% se a infecção for adquirida nas últimas semanas de gestação (Desmonts et al 1985; Desmonts 1982). Em média, a taxa de transmissão para o feto é de 14% para infecções adquiridas no primeiro trimestre de gravidez, 30% para o segundo e 59% para o terceiro.

Se a primoinfecção materna for adquirida pouco antes da concepção ou durante a gravidez, o *T. gondii* pode ser transmitido via placenta para o feto, resultando em infecção aguda que pode levar a graves sequelas. O mecanismo de invasão fetal pelo toxoplasma ainda não está totalmente esclarecido, acredita-se que a parasitemia temporária durante a primoinfecção da mãe, possa resultar na invasão da placenta por taquizoítos que aí se multiplicariam. Eventualmente, alguns destes poderiam atravessar a placenta, alcançando a circulação e os tecidos fetais (Tenter et al 2000).

Mulheres infectadas entre 4ª e 6ª semanas antes da concepção, desenvolvem imunidade mediada principalmente por imunoglobulinas da classe G, com efeito protetor para o feto, porém se a infecção é adquirida depois deste período, a transmissão vertical poderá ocorrer (Gagne 2001). Enquanto o risco de transmissão aumenta conforme avança a gestação, o risco de toxoplasmose

congênita sintomática e a gravidade da doença estão inversamente relacionados a semana em que a infecção materna foi adquirida. Desta forma, infecções adquiridas tardiamente apresentam sintomas mais brandos, enquanto que infecções adquiridas nas primeiras semanas de gravidez apresentam-se com sintomas mais graves. A maior freqüência de anomalias graves no nascimento foram observados em crianças cujas mães adquiriram a doença entre a 10ª e 24ª semanas de gravidez (Gagne 2001).

Um dos grandes problemas no que tange a toxoplasmose congênita reside no fato de que a infecção materna é geralmente assintomática, não sendo detectada, permitindo assim a instalação da infecção fetal pelo *T. gondii* (Frenkel 1996). Devido a este fato, discute-se atualmente, a utilização de screenins sorológicos que atinjam todas as mulheres em idade fértil, identificando-se aquelas soronegativas, que formam o principal grupo de risco. Entretanto a viabilidade desta proposta é questionável, principalmente no quesito custo x benefício, só sendo viável em países com baixas prevalências da infecção, onde o número de mulheres em idade fértil soronegativas é muito alto (Sukthana 2006).

A utilização de apenas um teste sorológico para identificação de casos suspeitos também apresenta-se como problema, pois os títulos de anticorpos podem permanecer altos por anos e não indicam necessariamente uma infecção recente. Desta forma, o mais interessante seria o emprego de testes rotineiros nas grávidas, objetivando identificar o aumento seqüencial dos títulos de anticorpos (indicação de infecção recente), entretanto esta proposta mostra-se dispendiosa e com benefícios finais limitados (Frenkel 1996). Desmonts & Couvreur 1974 propuseram que utilizando-se apenas um teste sorológico, teremos um teste positivo devido a infecção adquirida na gravidez para vinte ou trinta testes positivos devido a infecções passadas.

Um estudo realizado em 2001 por 20 centros de referência europeus, recomendou a combinação de dois ensaios com 95% de especificidade (preferencialmente testes de avidez de IgG e IgM), que apresentando-se ambos positivos, confirmariam um quadro de infecção recente (Sukthana 2006).

Gagne 2001 por outro lado, propõe que a adoção de medidas simples como o uso de questionários epidemiológicos e programas informativos a população, principalmente as mulheres em idade fértil, seriam suficientes para diminuir em 63% a soroconversão durante a gravidez. Este método identificaria hábitos de risco (contato com gatos, ingestão de carnes mal cozidas etc) e permitiria a prevenção da soroconversão, sendo muito mais barato que inquéritos soroepidemiológicos.

2.5 - Resposta imunológica ao *T. gondii*

A resposta imune à infecção toxoplásmica é complexa e envolve mecanismos humorais e celulares (Kawazoe 2003). Em geral, a infecção por *T. gondii* induz a uma resposta imunológica potente e protetora, que é insuficiente para eliminar completamente o parasita (Denkers et al 2004; Alexander & Hunter 1998; Denkers & Gazzinelli 1998; Yap & Sher 1999). A imunidade celular aparentemente possui papel chave na reação imune do hospedeiro frente ao ataque por *T. gondii* (Lindberg & Frenkel 1977; Schluter et al 1991). Os macrófagos, as células "natural killer"(NK), bem como as citocinas, são os principais elementos envolvidos na resposta imune, enquanto os anticorpos possuem papel secundário (Filisetti & Candolfi 2004).

A resposta imunológica ao *T. gondii* inicia-se logo após a infecção, pois o parasita é capaz de desencadear a ativação não-específica de macrófagos (Filisetti & Candolfi 2004), que juntamente com as células NK formam a primeira linha de defesa contra o *T. gondii* (Roberts & McLeod 1999). Os macrófagos possuem papel crucial na resposta imune pois, são estimulados pelos taquizoítos a produzirem interleucina 12 (IL-12) (Gazzinelli et al 1993; Sher & Sousa 1998) que por sua vez, ativa as células NK e células T, que produzem interferon-γ (INF-γ), sendo este crucial para a resistência a infecção (Bhopale 2003). A ação sinérgica do INF-γ com o fator de necrose tumoral (TNF) media a destruição dos taquizoítos pelos macrófagos. Os mecanismos de destruição incluem mecanismos oxidativos e não oxidativos (com destaque para a ação do óxido nítrico), produtos

do metabolismo do ácido araquidônico (Roberts & McLeod, 1999) e degradação do triptofano intracelular pela indolamina 2, 3–dioxigenase (Pfefferkorn et al 1986). O mecanismo não específico de defesa possui seu pico na primeira semana de infecção, declinando vagarosamente até desaparecer por volta da segunda semana (Filisetti & Candolfi 2004). A resposta imunológica não específica leva a diferenciação de macrófagos e células B em células apresentadoras de antígenos, estimulando a ação de células efetoras (Filisetti & Candolfi 2004), estas exercem sua função via atividade citotóxica e/ou secretando citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (Hunter et al 1994).

Entre as populações de células T, as CD8+ são consideradas as mais efetoras, sendo responsáveis pela proteção contra a infecção por *T. gondii*, enquanto que as CD4+ possuem um papel de ação sinérgico com as primeiras (Parker et al 1991; Denkers et al 1996). A linhagem CD8+ é ativada especialmente por antígenos de superfície do parasito (Kasper et al 1992) sendo essencial na fase aguda da infecção (Denkers et al 1993; Subauste et al 1991) pois exerce função citotóxica para taquizoítos e células infectadas (Subauste et al 1991; Yano et al 1989). A linhagem CD4+ por sua vez é dividida é em duas sub-populações, Th1 e Th2 baseado nas citocinas liberadas após a estimulação. A sub-população Th1 produz IL-2 e IFN-γ e a Th2 produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Enquanto as citocinas produzidas pela sub-população Th1 estão associadas a ação protetora contra a infecção, as citocinas produzidas pela sub-população Th2 estão relacionadas a baixa regulação da resposta imune e promoção da multiplicação dos parasitas (Roberts & McLeod 1999; Mosmann & Moore 1991; Denkers et al 2004).

Nesta década, diversos estudos têm relacionado à virulência aguda de cepas do tipo I de *T. gondii* com a capacidade destas de gerar uma resposta imunológica com níveis extremamente altos de citocinas do grupo Th1, que provavelmente contribuiria com a lesão tecidual e até morte do indivíduo, enquanto que as cepas avirulentas dos tipos II e III gerariam também uma resposta do tipo Th1, mas com as citocinas em níveis adequados (Sibley 2003; Gavrilescu & Denkers 2001; Mordue et al 2001; Saeij et al 2005). Muitas destas

informações, no entanto, foram obtidas de modelos experimentais em camundongos, não podendo ser diretamente transpostas para o modelo humano, necessitando de estudos mais aprofundados (Filisetti & Candolfi, 2004).

As células B produzem imunoglobulinas das classes M, G, A e E contra antígenos de *T. gondii*, estas na presença de complemento permitem a lise de taquizoítas extracelulares (Bhopale 2003; Schreiber & Feldman 1980) não possuindo ação entretanto sobre os parasitas intracelulares (Roberts & McLeod 1999). Após o surgimento da imunidade específica, os taquizoítos desaparecem dos tecidos, permanecendo viáveis sobre a forma de bradizoítos dentro de cistos teciduais (Kawazoe 2003; Frenkel 1996). Estes cistos não podem ser destruídos pelo sistema imune e podem permitir a reagudização de um quadro crônico de toxoplasmose, se houver alguma ruptura do equilíbrio imune (Roberts & McLeod 1999; Filisetti & Candolfi 2004).

3 - OBJETIVOS DO TRABALHO

Visando contribuir para a melhor compreensão da epidemiologia da toxoplasmose na cidade de Goiânia, este trabalho tem como objetivos:

3.1- Objetivos gerais

Determinar a soroprevalência, isolar e caracterizar quanto a virulência para camundongos, cepas de *T. gondii* em galinhas comercializadas nas feiras livres da

cidade de Goiânia

3.2 - objetivos específicos

- Avaliar a prevalência de anticorpos contra o *T. gondii* no soro das aves através do teste de aglutinação modificado (MAT).
- Isolar *T. gondii* dos tecidos destas aves, através de bioensaio com inoculação em camundongos.
- Investigar a virulência dos possíveis isolados através de inoculações com diferentes concentrações de parasitos
- Determinar a possível presença de cistos *T. gondii* nas aves e camundongos utilizados no bioensaio, através da análise de cortes histológicos dos órgãos (cérebro e coração) destes animais
- Investigar a soroconversão nos camundongos sobreviventes do bioensaio através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Obtenção das amostras

Foram obtidas 50 aves em feiras livres na cidade de Goiânia, estado de Goiás no período de janeiro a setembro de 2005, estas foram devidamente acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e guardadas em isopor com gelo. Posteriormente foram levadas ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG) onde foram processadas com a retirada do sangue, do cérebro e do coração. Através de entrevista informal com os feirantes, foram selecionadas aves que se enquadravam no seguinte perfil: (a) animais criados livres em quintais localizados dentro dos limites da cidade, (b) que não receberam alimentação industrializada ou qualquer tipo de medicação (como antibióticos), (c) animais que foram abatidos e prontamente levados para comercialização não passando por processo de congelamento.

As amostras foram obtidas nas feiras livres dos seguintes setores: Urias Magalhães, Pedro Ludovico, Vila Nova, Praça do Ipê e CEPAL (setor Sul). Entretanto é importante destacar que em entrevista informal, todos os feirantes declararam comercializar suas aves em mais de uma feira semanalmente.

4.2 - Processamento das amostras

No laboratório, as amostras foram processadas para o isolamento do parasita seguin do a metodologia descrita por Dubey 1998b com pequenas modificações. No modelo proposto por este autor, apenas o material proveniente de galinhas positivas para o MAT foi inoculado em camundongos, enquanto que neste estudo procedeu o modelo de inoculação “as cegas”, ou seja, o material de todas as galinhas foi processado e inoculado de maneira semelhante, independente da detecção ou não de anticorpos anti *T. gondii.* Num primeiro momento, foram retirados o tecido conectivo e a gordura com o auxílio de uma tesoura, em seguida os órgãos foram lavados com solução salina e secos com

papel toalha. Posteriormente foram seccionados fragmentos do coração e cérebro das aves com cerca de 1/6 do tamanho total do órgão. Estes fragmentos foram conservados em tubos contendo formaldeído a 10% para estudo histológico. As porções restantes dos órgãos passaram por processamentos distintos de isolamento do parasita.

4.3 - Processamento do sangue das aves

O sangue das aves, após a coagulação, foi centrifugado a 4000 RPM/15 minutos, o soro obtido foi retirado, aliquotado, identificado e armazenado em tubos de polipropileno a -20ºC para futura sorologia.

4.4- Teste de aglutinação modificado (MAT)

A análise sorológica das galinhas foi realizada pelo teste de aglutinação modificado (MAT) segundo metodologia descrita por Desmonts & Remington 1980. Estes autores fizeram modificações a partir da metodologia original, adicionando 2-mercaptoetanol no tampão de diluição de antígeno, objetivando aumentar a sensibilidade e especificidade do teste, por eliminação de reações do parasito com IgM não específica para *T. gondii.*

4.4.1 - Preparo de antígeno para o MAT

Para a realização do MAT foi utilizado como antígeno taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH). A cepa RH foi mantida no laboratório de protozoologia do IPTSP-UFG, através de passagens sucessivas em camundongos e por processo de criopreservação. Para a obtenção do antígeno, após a retirada da criopreservação, o *T. gondii* sofreu duas passagens em camundongos Balb-c, objetivando o aumento da virulência. Após 72 horas os animais infectados apresentavam sintomas agudos de toxoplasmose (pêlos arrepiados, intensa taquicardia e prostração). Logo após a morte dos camundongos foi feito o lavado

intraperitoneal onde se obteve um material com quantidade significativa de taquizoítos e desprovido de células. A ausência de células no lavado é importante, pois estas diminuem a sensibilidade do teste.

Foram obtidos lavados de seis camundongos, estes foram misturados, centrifugados a 5000 RPM/15 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 5 mL de PBS e realizada a contagem de taquizoítos com o auxílio de câmara de Neubauer. A concentração então foi ajustada para cerca de 25.000 taquizoítos/µL, o material novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em formalina diluída em PBS 1:5 (solução de formaldeido à 6%). Foi realiza nova contagem dos parasitos para confirmar a concentração destes na solução. Os taquizoítos foram mantidos nesta solução por 16 horas, e então centrifugados e suspensos em PBS por três vezes, objetivando a retirada da formalina. Após a última lavagem, o sedimento foi suspenso em tampão alcalino (7,02g de NaCl, 3,09g de H_3BO_3, 24 mL de NaOH, 4g de albumina de plasma bovino e água destilada suficiente para alcançar 1 litro) pH 8,7. A concentração foi aproximadamente de 20.000 taquizoítos por µL.

4.4.2 – Realização do MAT

O teste foi realizado em placas de Elisa com fundo em U, onde em cada poço foi adicionado 50 µl de 2 mercaptoetanol 0.2 M (14 mL/litro), 50 µl de antígeno e 50 µl do soro a ser testado previamente diluído em PBS. Em seguida a placa foi agitada cuidadosamente e incubada por 16 horas à 32ºC. Cada soro passou primeiramente por uma triagem em duas diluições 1:5 e 1:10, aqueles com resultado positivo, foram então testados para outras diluições (Fig.1).

As placas foram lidas após 48 horas (a leitura pode ser feita entre 16 e 72 horas sem modificação significativa dos resultados). Os anticorpos anti *T. gondii* presentes nos soros positivos, ligam-se ao antígeno através de uma reação de aglutinação, formando uma rede que impede a precipitação dos taquizoítos, desta forma, nas amostras positivas os poços apresentaram-se límpidos, sem sedimento no fundo da placa. Nas amostras negativas, como não há reação de aglutinação,

os taquizoítos sedimentaram formando um precipitado no fundo da placa.

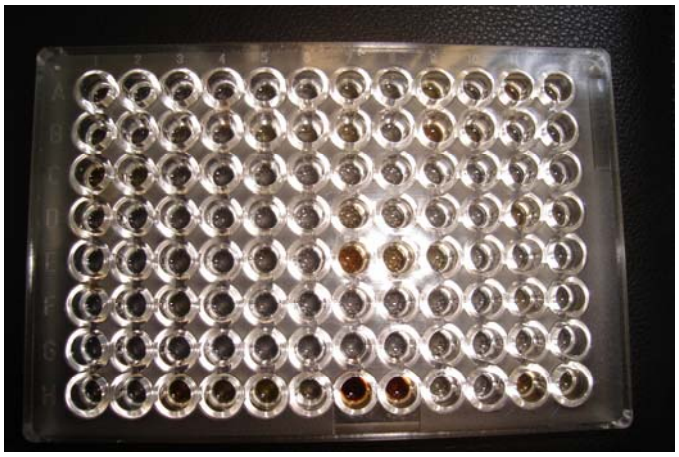


FIGURA 1 – Placa de Elisa com fundo em U para realização do MAT.

4.5- Bioensaio em camundongos

4.5.1- Animais utilizados

Os camundongos utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG). Os animais eram da linhagem Balb-c de ambos os sexos pesando aproximadamente 20g.

Para cada ave estudada foram utilizados seis camundongos, três inoculados com material proveniente do cérebro e três com material proveniente do coração da ave. Após a inoculação os animais foram mantidos no biotério do IPTSP-UFG onde receberam ração comercial e água *ad libitum*. Os camundongos foram observados diariamente por um período de 60 dias, tomando-se especial atenção para o surgimento de sintomas típicos de toxoplasmose aguda (diarréia, cegueira, letargia e pêlos arrepiados).

4.5.2 - Processamento do coração das aves

Cada amostra de coração foi cortada em pequenos pedaços com o auxílio

de uma tesoura, acondicionada num gral e macerada com o auxílio de um pistilo. Durante o processo de maceração, foi adicionado solução salina numa proporção de 60 mL de salina para 25g de tecido. Em seguida foi adicionado 120 mL de solução péptica (pepsina 2,6g; NaCl 5,0g; HCl 7,0 mL e água destilada o suficiente para completar 500 mL; pH de aproximadamente 1,1-1,2) pré-aquecida à 37ºC. O homogeneizado foi então colocado em tubos de polipropileno, levado ao banho-maria à 37ºC e agitado a cada dez minutos. Após uma hora o homogeneizado foi filtrado em gaze dupla, acondicionado em tubos e centrifugado a 5000 RPM/10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e suspenso em 10 mL de salina, este procedimento foi repetido por três vezes objetivando-se retirar a solução péptica do homogeneizado. Após a última lavagem, o sedimento foi suspenso em 4 mL de salina e inoculado em um grupo de três camundongos (1 mL em cada animal).

4.5.3 - Processamento do cérebro das aves

Cada amostra de cérebro de galinha foi acondicionada num gral, adicionados 4 mL de salina e macerado com o auxílio de um pistilo até se obter um homogeneizado. Este foi filtrado em gaze dupla e inoculado em um grupo de três camundongos (1 mL em cada animal).

4.5.4 - Manipulação dos animais sintomáticos

Os animais que apresentaram sintomas de toxoplasmose aguda foram sacrificados e realizada a lavagem peritoneal, onde foi inoculado cerca de 5 mL de salina na cavidade peritoneal do animal e o líquido recolhido com auxílio de uma seringa. Uma gota do lavado foi colocada sobre lâmina, coberta com lamínula e observada ao microscópio de luz e examinado em aumento de 400X para procura de taquizoítos. Com o encontro ou não destes, o lavado foi centrifugado a 4.000

RPM/12 minutos, o sobrenadante descartado, o sedimento suspenso em 1 mL de solução salina e inoculado em dois camundongos que foram observados como acima descrito. Quando encontrado taquizoítos, estes foram mantidos por duas ou três passagens em camundongos e criopreservados (Fig. 2).

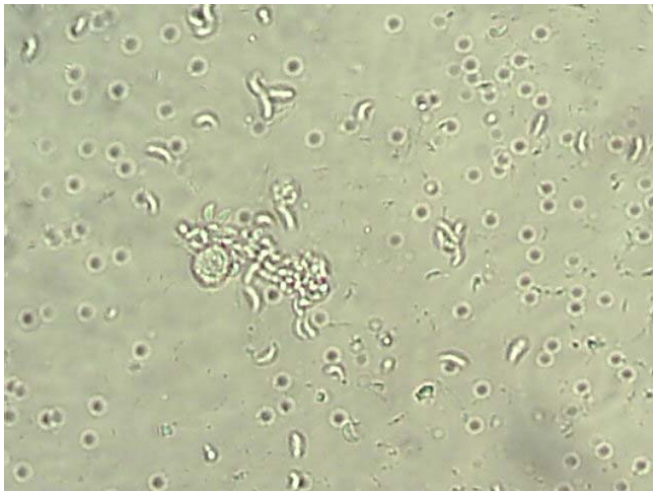


FIGURA 2– Lavado peritoneal contendo vários taquizoítas de *T. gondii.*

4.5.5 - Manipulação dos animais assintomáticos

Os animais que após 60 dias não apresentaram sintomas de toxoplasmose aguda, foram sacrificados, necropsiados e tiveram o cérebro e o coração retirados (Fig. 3). Fragmentos com cerca de 1/3 do tamanho total dos órgãos foram retirados e guardados em tubos contendo formaldeído a 10% para estudo histológico.

O restante dos órgãos foram processados separadamente segundo metodologia acima descrita, após a filtragem em gaze e retirada da solução péptica através de sucessivas lavagens, os homogenatos foram misturados formando um "pool". Este foi inoculado em três camundongos objetivando um possível isolamento do parasita. Os animais foram observados diariamente por 60 dias conforme metodologia descrita.

Após este período aqueles que não apresentaram sinais de toxoplasmose aguda foram sacrificados e o experimento encerrado.

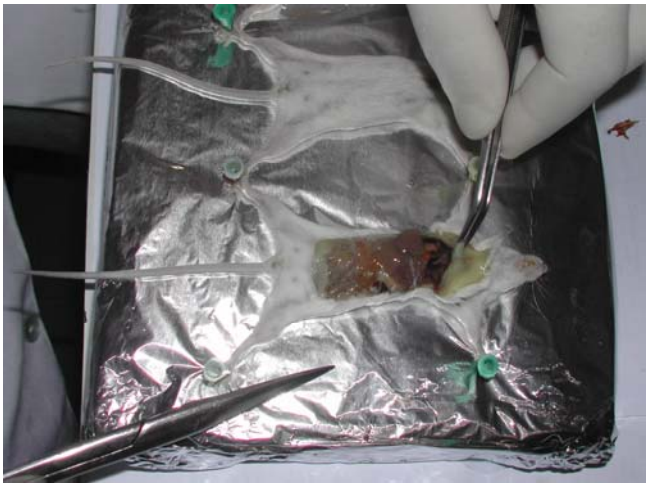


FIGURA 3 – Necropsia de camundongos para retirada de amostras de coração e cérebro.

4.6- Estudo da virulência dos isolados

Das 50 aves estudadas foram obtidos três isolados denominados 32 A, 33 A e 33 B . Estes isolados de *T. gondii*, foram submetidos individualmente a estudo de virulência em camundongos através de inoculações com diferentes concentrações de taquizoítos. Para isto, cada isolado foi mantido por duas passagens consecutivas em camundongos, posteriormente os animais foram sacrificados e realizada a lavagem intraperitoneal. O material obtido foi centrifugado em 5000 RPM/15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em salina. Em seguida foi feita à contagem dos taquizoítos com o auxílio de câmara de Neubauer. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas com concentrações de 10 a 10^6 taquizoítos. Essas foram inoculadas em grupos de cinco camundongos Balb-c, que foram mantidos no biotério do IPTSP-UFG, sendo observados, para o surgimento de sintomas clínicos de toxoplasmose aguda e eventual morte do animal durante 60 dias após a infecção. Após morte espontânea foi realizado o lavado intraperitoneal nos camundongos objetivando o

encontro de taquizoítos de *T. gondii.* Como controle foi utilizada a cepa RH, cuja biologia e comportamento foram caracterizados por Dubey 1977. Os animais sobreviventes após 60 dias foram sacrificados e tiveram seu soro retirado para estudo através da RIFI, objetivando a confirmação da infecção.

4.7- Obtenção do soro dos camundongos para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os camundongos inoculados com cérebro e coração das aves, após o sacrifício, tiveram uma amostra do sangue recolhida por punção cardíaca (Fig. 4).

FIGURA 4– Punção cardíaca em camundongo.

Para realização da punção o animal foi sacrificado por deslocamento cervical, realizado a desinfecção da região torácica com álcool iodado, introduziu-se uma agulha 24 X ½ com seringa de 1 mL estéril (ambas heparinizadas) paralelamente a linha do esterno, em direção ao lado esquerdo do animal no antepenúltimo espaço intercostal num ângulo de aproximadamente 45º e succionou-se o volume de sangue desejado (aproximadamente 1 mL).

O sangue retirado foi centrifugado a 3.000 RPM/10 minutos, o soro obtido foi transferido para tubos de polipropileno devidamente identificados e guardados a -20ºC até o momento de serem utilizados na RIFI.

4.8- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no soro dos camundongos

Objetivando o encontro de anticorpos anti *T. gondii* (Imunoglobulinas das classes G e M), os soros dos camundongos foram analisados pela técnica de RIFI, segundo metodologia de Camargo 2001, onde, o soro foi descongelado até alcançar a temperatura ambiente e em seguida foi diluído em salina tamponada (PBS). Para este estudo foi realizada primeiramente uma triagem com diluições de 1/16 para IgG e 1/8 para IgM, em seguida o soro diluído foi colocado em lâminas com poços sensibilizadas com taquizoítos de *Toxoplasma* (Bioshop). As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas em estufa por 30 minutos à 35ºC. Após este período as lâminas foram lavadas em PBS por duas vezes (cinco minutos cada), secas e adicionado o conjugado. Foram utilizados os conjugados IgG e IgM fluorescente de cabra anti-camundongo (conjugado anti-cadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA) diluído numa proporção de 1/200 em solução de azul de Evans a 1%. As lâminas foram para a câmara úmida e novamente incubadas em estufa por 30 minutos à 35ºC e depois lavadas duas vezes em PBS (cinco minutos cada). Posteriormente foram secas, cobertas com glicerina tamponada e observadas ao microscópio. A reação foi considerada positiva quando todo o perímetro dos taquizoítos na lâmina se mostrou definido e fluorescente com coloração esverdeada (Fig. 5).

O resultado foi considerado negativo quando os taquizoítos se mostravam pouco definidos com coloração avermelhada e sem fluorescência.

Cada soro foi triado duas vezes, aqueles considerados positivos foram então estudados nas seguintes diluições de 1/32 e 1/64 para IgG e 1/16 e 1/32 para IgM. Durante todo o estudo foram utilizados soros controles positivos e negativos, o primeiro obtido de infecção experimental de camundongos com *T. gondii* e o segundo obtido de animais não infectados oriundos do biotério do IPTSP – UFG.

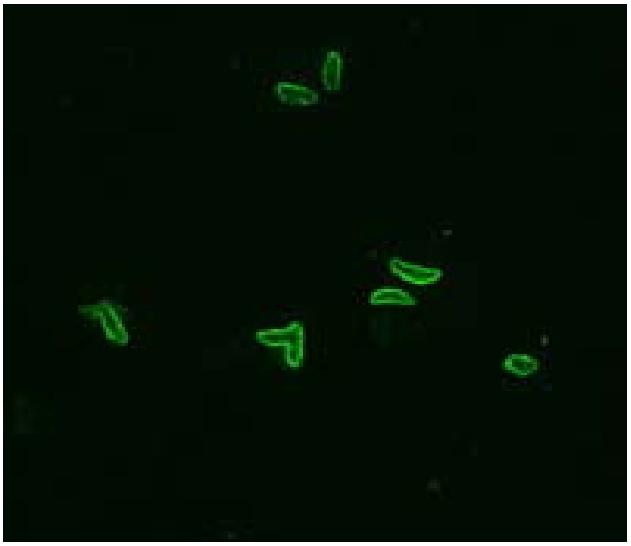


FIGURA 5– Reação de imunofluorescência indireta positiva para *T. gondii.*

4.9- Criopreservação dos isolados obtidos

Os isolados de *T. gondii* obtidos neste estudo foram criopreservados conforme a metodologia a seguir. Após o isolamento, os parasitos sofreram duas a três passagens em camundongos, visando obter um número maior de taquizoítos no lavado intraperitoneal. Após a última passagem, foi realizada a lavagem intraperitoneal, o material obtido centrifugado a 4000 RPM/15 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em aproximadamente 1 mL de salina. Logo após foi acrescentado 0,5 mL de DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)/BSA (albumina sérica bovina) 16% e 0,5 mL de DMEM/DMSO (dimetil sulfóxido) 50%, onde as concentrações finais de BSA e DMSO foram de 4% e 12,5% respectivamente. As amostras foram acondicionadas em criotubos, incubados por 20 minutos à -20ºC, em seguida à -70ºC por 18-20 horas. Terminado este período as amostras foram transferidas para os criotanques contendo nitrogênio líquido.

4.10 - Confecção de lâminas das amostras de aves para estudo histológico

Fragmentos dos órgãos (coração e cérebro) das aves foram individualmente emblocados em parafina quente, cortados em micrótomo e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina para busca de formas císticas de *T. gondii*. Estes procedimentos foram realizados segundo técnicas descritas por Junqueira 1983, onde, as amostras passaram por uma bateria crescente de álcoois visando à desidratação. Primeiramente os órgãos ficaram 30 minutos embebido em álcool 50%, sendo depois transferido para o álcool 70%, 80%, 90%, 95%, álcool absoluto I, II e III onde ficaram 30 minutos em cada concentração. Posteriormente as amostras foram embebidas em uma solução contendo álcool e xilol a 50% por 15 minutos, passando depois por uma bateria de xilol I, II e III, onde permaneceram 15 minutos em cada, visando a diafanização. Em seguida, as amostras foram mergulhadas numa bateria de parafina quente I, II e III, onde permaneceram 10 minutos em cada. Após este procedimento, as amostras foram emblocadas em parafina definitiva (55ºC) em fôrmas de plástico. Após o resfriamento, os blocos foram cortados em micrótomo, onde foram confeccionados 10 cortes de 5 µm de cada órgão, que foram colocados em lâminas de microscopia devidamente identificadas. Depois da secagem, as lâminas passaram por nova bateria de xilol (I,II e III) três minutos em cada, seguida de uma bateria decrescente de álcool (absoluto I e II, 90%, 80%, 70%) dois minutos em cada. Posteriormente as lâminas sofreram um rápido mergulho em água, sendo em seguida mergulhadas em hematoxilina (entre 1 e 2 minutos) e lavadas em água corrente por dez minutos, mergulhadas em eosina (aproximadamente um minuto) e passadas ligeiramente em bateria crescente de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I e II). Logo após foram passadas numa bateria de xilol (I, II e III) cerca de três minutos em cada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e posteriormente observadas ao microscópio de luz no aumento de 200X para procura de estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii*.

4.11 - Confecção das lâminas de amostras de camundongos para

estudo histológico

Os órgãos (cérebro e coração) dos camundongos passaram pelo mesmo processo descrito acima para confecção de lâminas histológicas, objetivando a procura de estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii*. Devido ao grande número de órgãos para serem analisados, optamos por estudar apenas dois dos três órgãos existentes em cada experimento. Para tanto foram criados critérios para seleção dos órgãos a serem estudados: (a) órgãos de camundongos positivos na RIFI, (b) órgãos de animais com os maiores títulos na RIFI, (c) caso existissem animais no experimento com a mesma titulação ou todos os animais fossem negativos na RIFI, eram sorteados aleatoriamente dois órgãos como amostras.

4.12 – Seleção dos cortes para estudo histológicos

Os órgãos (cérebro e coração) tanto das aves como dos camundongos foram cortados seguindo um padrão, onde de cada amostra foram realizados aproximadamente 100 cortes. Deste total, 10 foram selecionadas aleatoriamente para a confecção de lâminas para o estudo histológico. O único parâmetro utilizado para a seleção foi o perfeito estado do corte que não poderia apresentar-se incompleto, enrugado ou com estrias.

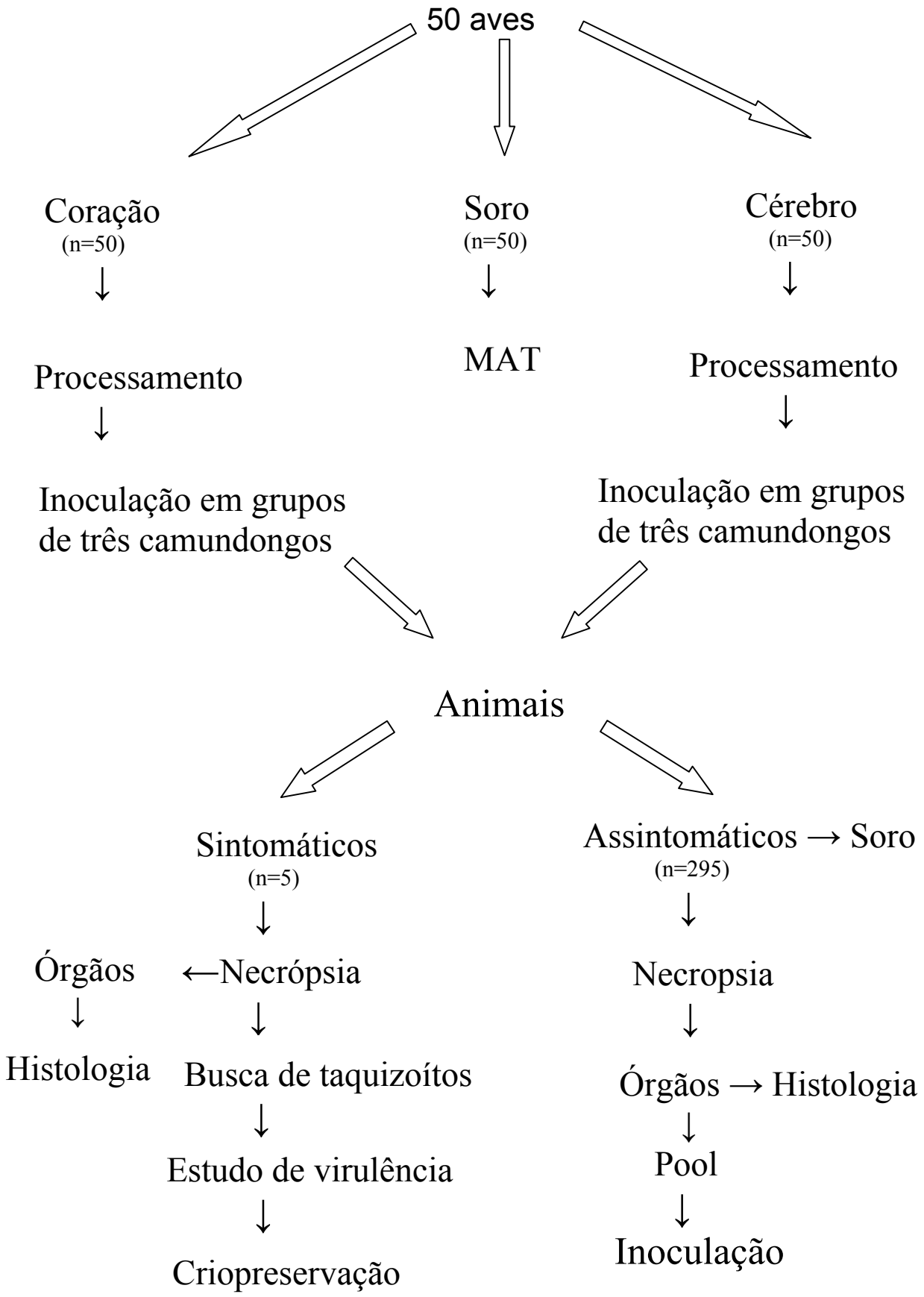


FIGURA 6- Fluxograma com os procedimentos descritos

5 - RESULTADOS

5.1- Prevalência de anticorpos pelo MAT

Anticorpos anti *T. gondii* foram encontrados no soro de 25 (50%) das 50 aves testadas, com títulos de 1:5 em 4; 1:10 em 10; 1:20 em 4; 1:40 em 1; 1:80 em 3; 160 em 1; 1:200 em 1 e 1:400 em 1. Um total de 25 galinhas (50%) apresentaram-se negativas no teste (Tab.1).

5.2 - Isolamento de *T. gondii* a partir de cérebro e coração de galinha

Um total de três isolados foram obtidos, entretanto dois destes foram oriundos de material da mesma ave não sendo possível dizer tratar-se de cepas diferentes ou não, desta forma, *T. gondii* foi isolado de duas galinhas perfazendo 4% do número total de aves e 8% das aves positivas pelo MAT.

Dois destes isolados foram provenientes de amostras de cérebro e um de amostra de coração de galinha. Estes foram oriundos do primeiro inoculo em camundongo, não sendo feito isolamento a partir do segundo inoculo (pool de órgãos).

O isolamento de *T. gondii* obteve sucesso a partir de material proveniente das aves com maiores títulos para o MAT, no grupo número 32 a galinha apresentou título de anticorpos de 1:200 sendo isolados parasitos a partir do cérebro da ave. Enquanto que no grupo número 33, a ave apresentou título de anticorpos de 1:400 e *T. gondii* foi isolado a partir de amostras do coração e cérebro.

No grupo número 33, dois camundongos que receberam o coração da ave morreram oito dias após a inoculação e o exsudado peritoneal destes animais mostrou-se rico em formas taquizoíticas, o animal restante permaneceu vivo durante todo o experimento. Também no grupo 33, após 22 dias um animal que foi inoculado com o cérebro da ave apresentou sintomas de toxoplasmose aguda e o lavado peritoneal apresentou-se com poucos taquizoítos, enquanto que os dois animais restantes permaneceram vivos durante todo o experimento.

No grupo número 32, dois animais inoculados com o cérebro da ave apresentaram sintomas de toxoplasmose aguda, 40 dias após a inoculação e o lavado peritoneal apresentou-se com pouquíssimos taquizoítos, o camundongo restante permaneceu vivo durante todo o experimento (Tab.1).

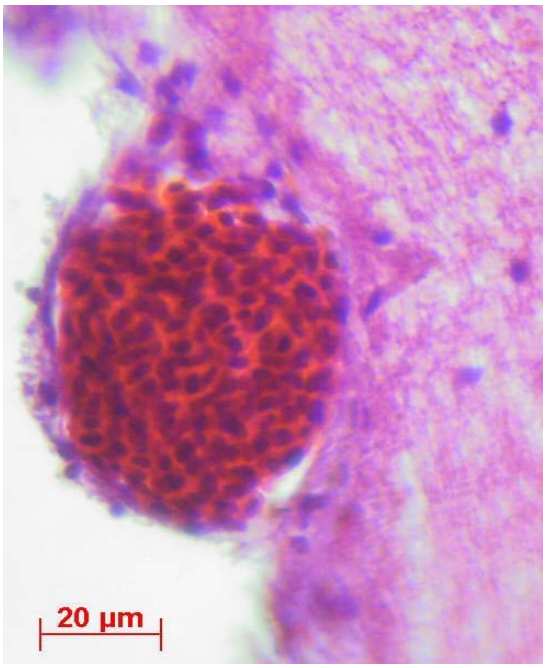
Tabela 1- Soroprevalência, histologia e isolamento de *T. gondii* de galinhas no município de Goiânia-GO.

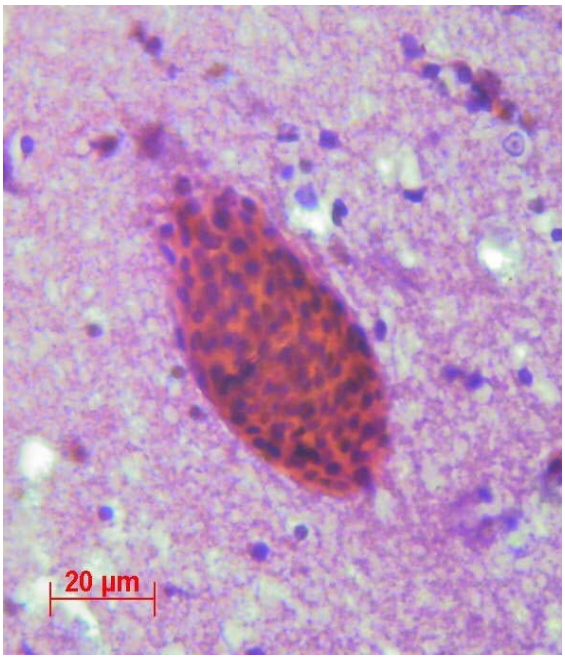
		Histologia das aves		Isolamento de *T. gondii*	
Galinhas	MAT	cérebro	coração	cérebro	coração
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	01:20	-	+	-	-
21	01:20	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	01:20	+	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	01:05	+	+	-	-
26	-	-	-	-	-
27	01:10	-	-	-	-
28	01:10	-	-	-	-
29	01:05	+	-	-	-
30	01:05	-	-	-	-
31	01:80	-	-	-	-
32	01:200	-	-	+	-
33	01:400	+	-	+	+
34	01:80	-	-	-	-
35	01:160	+	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-
41	01:10	-	-	-	-
42	01:10	-	-	-	-
43	01:10	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-
46	01:10	-	-	-	-
47	01:10	-	-	-	-
48	01:10	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-
52	01:20	-	-	-	-
53	01:10	-	-	-	-

54	01:80	+	-	-	-
55	01:05	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-
59	01:40	+	-	-	-
60	01:10	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-

5.3- Estudo histológico de órgãos das aves

Das 50 aves estudadas, em oito (16%) foram encontradas estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii* (Fig. 7 A e B). Em seis aves, tais estruturas estavam presentes em amostras do cérebro, em uma ave na amostra de coração e em uma ave tais estruturas foram encontradas em amostras de cérebro e coração.





(A) (B)

FIGURAS 7 (A e B)– Estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii.*

5.4- Comparação da virulência dos isolados obtidos

Os isolados de *T. gondii* obtidos foram estudados quanto a sua virulência para camundongos através de inóculos com diferentes concentrações de parasitos. As concentrações utilizadas foram 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 taquizoítos. O isolado 33 A mostrou-se com letalidade de 100% a partir da concentração de mil parasitos, enquanto que na concentração de cem taquizoítos a letalidade caiu para 60%, matando três animais dos cinco inoculados. Todos animais inoculados com a concentração de dez taquizoítos sobreviveram, entretanto a investigação através da RIFI mostrou que dos cinco camundongos apenas três soroconverteram (RIFI ≥1:16). Este isolado matou os camundongos entre o 6º e o 39º dia pós inóculo.

O isolado 33 B, da mesma forma apresentou-se com 100% de letalidade a partir da concentração de mil parasitas, na concentração de cem taquizoítos a mortalidade sofreu uma queda para 20%, enquanto que a concentração de dez parasitos não provocou a morte de nenhum animal. O estudo com a RIFI mostrou que nesta concentração dois animais não soro converteram. Neste isolado as mortes ocorreram entre o 4º e o 40º dia pós inóculo.

O isolado 32 A mostrou-se com 100% de letalidade a partir da concentração de dez mil parasitos, esta caiu para 40% na concentração de mil e 20% na de cem taquizoítos, o estudo com a RIFI mostrou que nesta concentração, dois camundongos não soroconverteram. A concentração de 10 parasitas não provocou a morte de nenhum animal, entretanto o estudo com a RIFI mostrou que apenas um animal soroconverteu. Este isolado provocou a morte de animais entre o 8º e 42º dia após a inoculação (Tab. 2).

Tabela 2. Comparação da virulência dos isolados 33A, 33B e 32A de *T. gondii* após inóculo com diferentes concentrações de taquizoítas, em que é expresso o número e tempo de mortalidade dos camundongos.

		Camundongos (inóculo isolado 33A)		**Camundongos (inóculo isolado 33B)**		**Camundongos (inóculo isolado 32A)**	
Concentração de taquizoítos	Nº de camundongos	Mortalidade pós inóculo (%)	Média de mortalidade (em dias)	Mortalidade pós inóculo (%)	Média de mortalidade (em dias)	Mortalidade pós inóculo (%)	Média de mortalidade (em dias)
10^1	5	0	0	0	0	0	0
10^2	5	60	38	20	40	20	42
10^3	5	100	19	100	20	40	30

10^4	5	100	15	100	12	100	25
10^5	5	100	9	100	6	100	21
10^6	5	100	8	100	5	100	20

5.5- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no soro dos camundongos

Foi realizado a RIFI em todos os soros dos camundongos sobreviventes, objetivando a busca de anticorpos anti *T. gondii* das classes IgG e IgM, no entanto, apenas camundongos inoculados com material proveniente de aves positivas pelo MAT, apresentaram evidências de soroconversão.

Em apenas um camundongo a reação foi positiva para IgM na titulação de 1:8, o que indica ser um resultado falso positivo, pois todos os camundongos foram sacrificados com no mínimo 60 dias pós-inoculação.

Dos 25 grupos com inóculos de órgãos de galinhas soropositivas, em 11 (44%) houve a detecção de IgG anti *T. gondii* em pelo menos um camundongo do experimento (Tab. 3).

Tabela 3- soropositividade e titulação pela RIFI de camundongos inoculados com cérebro e coração de galinha.

	camundongos infectados			
Número	Amostras de cérebro		Amostras de coração	
do experimento	Positivos*	Titulação	Positivos*	Titulação
20	1	1:16	1	1:16
21	1	1:16	1	1:16
27	1	1:16	1	1:16
28	1	1:16	1	1:16
29	2	1:16	0	-
30	2	1:16	0	-
41	0	-	2	1:16
46	0	-	1	1:16
47	0	-	1	1:16
48	2	1:32	0	-
52	2	1:16	0	-
59	2	1:16	0	-
60	1	1:16	0	-

* Infectados grupos de três animais.

5.6- Estudo histológico de órgãos de camundongos

Dos 100 grupos de animais inoculados, em dois (2%) foram encontradas estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii.* No grupo número 32, tais estruturas foram encontradas no cérebro de camundongos inoculados com o coração da ave e no grupo número 33 estas foram encontradas no coração e no cérebro de camundongos inoculados com o cérebro da ave.

6- DISCUSSÃO

O valor de soroprevalência de anticorpos anti *T. gondii em* "galinhas caipiras" encontrado neste estudo para a cidade de Goiânia é relativamente altos se comparado com os resultados obtidos em outras regiões. Por exemplo, no estado do Paraná em 40 aves estudadas a soroprevalência foi de 40% (Dubey et al 2003b), no Rio Grande do Sul a soroprevalência foi de 38% numa amostragem de 50 galinhas (Dubey et al 2007), enquanto que em São Paulo, o índice foi de 39% em 82 aves estudadas (Dubey et al 2002).

Embora altos, os valores encontrados na cidade de Goiânia não são os mais elevados do Brasil, pois no estado do Pará em estudo que amostrou 34 aves (Dubey et 2007), a soropositividade encontrada foi de 58% e na cidade de Campos dos Goytacazes, ao norte do estado do Rio de Janeiro, a soropositividade encontrada ficou na ordem de 64% (Da Silva 2003) das 228 aves testadas. Em termos mundiais, os valores também se apresentam bastante variados, em Portugal a soroprevalência foi de 44% (225 aves), na Áustria 36% (830 aves), na Colômbia 44% (72 aves), no México 6% (208 aves), no Peru 28% (50 aves) no

Chile 55% (85 aves) e na Índia 18% (741 aves) (Dubey et al 2006b, 2005a, 2005b, 2004b, 2004a, 2006, Sreekumar et al 2003).

Os títulos encontrados nas aves deste estudo estão de acordo com aqueles obtidos nas diversas regiões do globo, chamando a atenção apenas o fato de não terem sido encontradas aves com títulos muito altos de anticorpos anti *T. gondii.* No estudo conduzido no Paraná, por exemplo, duas aves apresentaram títulos maiores que 1:1280, mas estes casos devem muito provavelmente a uma vigorosa resposta imunológica individual destes animais (Da Silva 2003).

Para a inoculação em camundongos objetivando o isolamento de *T. gondii,* foram selecionados o coração e o cérebro das aves, baseando-se em estudos prévios desenvolvidos por Dubey 1981, onde a partir de infecções experimentais de galinhas, estes órgãos mostraram-se mais freqüentemente infectados, quando comparados com os pulmões, olhos, rins, fígado, ovário e músculos peitorais.

Na metodologia proposta por Dubey 1998b, o coração e o cérebro da ave são digeridos juntos em solução péptica por uma hora a 37ºC, este processo visa à liberação dos bradizoítos que estão contidos nos cistos teciduais e também a sua concentração para potencializar as chances de isolamento (Dubey et al 2002). Entretanto o próprio autor especula que muito provavelmente apenas 10% dos bradizoítos liberados sobrevivam aos processos de digestão péptica e lavagem.

A metodologia utilizada neste estudo propôs o processamento diferencial das amostras das aves, enquanto os fragmentos de coração passaram pela digestão péptica proposta por Dubey 1998b, os de cérebro foram maceradas em salina, concentrados por centrifugação e inoculados nos animais. Este procedimento visou evitar a destruição dos bradizoítos, contidos em possíveis cistos teciduais, pela solução péptica e pelos procedimentos de lavagem.

Neste estudo foi obtido um total de três isolados, porém dois destes foram provenientes da mesma ave não sendo possível dizer tratar-se de cepas diferentes ou não. Desta forma, *T. gondii* foi isolado de duas galinhas perfazendo 4% do número total de aves e 8% daquelas positivas pelo MAT. Embora muito rara, a infecção de um mesmo animal com duas cepas diferentes de *T. gondii* já

foi descrita por Ajzenberg et al 2002 numa ovelha e por Dubey et al 2003a numa galinha no norte do estado do Rio de Janeiro.

A taxa de isolamento de 8% das galinhas positivas pode ser considerada baixa se comparada com estudos similares desenvolvidos em outras regiões, como por exemplo, 22% de isolamento na Áustria, 71% na Colômbia, 46% no México, 76% no Peru e 75% no estado do Pará (Dubey at al 2005a, 2005b, 2004b, 2004a, 2007) . Entretanto todos estes estudos visavam a genotipagem dos isolados obtidos, para tanto, diversas técnicas adicionais ao bioensaio em camundongos foram utilizados para maximizar o sucesso do isolamento. Por exemplo, no estudo realizado no Peru, gatos "Toxoplasma-free" foram alimentados com órgãos de aves soronegativas e suas fezes foram analisadas para a presença de oocistos de *T. gondii,* enquanto que no estudo desenvolvido na Áustria foi feito um pool de cérebros de camundongos soropositivos que sobreviveram ao experimento e este foi inoculado em camundongos knock out (KO) para o interferon gama, pois tais animais são altamente susceptíveis a infecção toxoplásmica. Outra metodologia utilizada foi alimentar gatos "Toxoplasma-free" com pool de órgãos de camundongos soropositivos que, entretanto sobreviveram a todo o experimento. Posteriormente fazendo-se a busca de oocistos nas fezes dos felinos (Dubey et al 2002). Diversos fatores interferem diretamente no isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos, entre eles, o número de camundongos inoculados, a concentração de parasitas no tecido estudado e a quantidade de tecido utilizada no bioensaio (Dubey et al 2005a).

O titulo relativamente baixo de anticorpos anti *T. gondii* (MAT ≤ 1:80) encontrado em boa parte das aves estudadas pode estar diretamente relacionado a idade das aves, pois títulos baixos são indicativos de infecção recentemente adquirida (Da Silva 2003; Dubey et al 2003a) ou do declínio destes com o passar do tempo, visto que estudos anteriores mostram que em aves, os títulos de anticorpos contra o *Toxoplasma* caem com o decorrer de alguns meses, contrariamente ao que ocorre com os mamíferos que mantém tais títulos por anos (Aganda & Belino, 1984).

Os três isolados obtidos foram oriundos das duas aves com maiores títulos no MAT (1:200 e 1:400) sugerindo altas concentrações de parasitos nos tecidos destas, este dado corrobora com os da literatura, que mostram um maior sucesso de isolamento nas galinhas com títulos de MAT compreendidos entre 1:160 e 1:320 (Dubey et al 2004; Da Silva 2003; Dubey et al 2003b)

Durante todo o estudo, apenas cinco dos 300 camundongos apresentaram sinais clínicos de toxoplasmose, sendo obtidos taquizoítos do lavado peritoneal de todos. Este resultado é muito semelhante ao obtido em estudo realizado no Chile, onde dos 94 animais inoculados, apenas quatro apresentaram sintomatologia de toxoplasmose aguda (Dubey et al 2006a). Entretanto a virulência do *T. gondii* em camundongos, depende de muitos fatores incluindo o estágio do parasita inoculado, a rota de inoculação, a dosagem de parasitos, o tipo de animal utilizado e a cepa do parasito (Dubey et al 2002). Desta forma os resultado obtidos em estudos similares tem demonstrado grande discrepância nos resultados. Por exemplo, enquanto no estudo desenvolvido em São Paulo a taxa de mortalidade dos camundongos alcançou 100% dos animais em 30 dias, no estudo feito na Áustria todos os animais permaneceram assintomáticos durante o experimento (Dubey et al 2002; Dubey et al 2005a).

Neste estudo, amostras do cérebro e coração das aves e dos animais inoculados, foram cortados e corados com HE objetivando o encontro de estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii.* Os critérios morfológicos estabelecidos foram baseados naqueles propostos por Dubey 2004, onde os cistos teciduais apresentam-se em formato esférico ou semi oval, medindo entre 5 µm e 70 µm, com uma fina parede cística, sendo possível dentro do cisto observar os núcleos dos bradizoítos fracamente corados ou em alguns casos até mesmo os próprios bradizoítos. Foi feita a opção de não procurar outra formas de *T. gondii* como taquizoítos ou pseudocistos, visto que, em cortes histológicos corados com HE torna-se difícil à identificação do Toxoplasma, pois este não possui características tintoriais próprias que permitam distinguí-lo nitidamente das células adjacentes podendo ser confundido com núcleos e

fragmentos celulares que se coram de maneira semelhante (Farrel et al 1952; Tsunematsu et al 1964; Barbosa 1988).

Das 50 aves, foram encontradas estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii* em oito, sendo seis em cérebro, uma em coração e uma em cérebro e coração. Enquanto que nas amostras de camundongos, dos 100 grupos estudados em apenas dois houve o encontro de tais estruturas. Diversos estudos têm utilizado a histologia como método para a pesquisa de *Toxoplasma* em tecidos de diversos animais, entretanto os resultados e a eficácia deste estão diretamente ligados a diferentes fatores. O tamanho do animal parece ser o primeiro ponto importante, pois animais grandes provavelmente propiciam uma maior dispersão dos cistos nos tecidos dificultando seu encontro. Da silva & Langoni 2001 não encontraram cistos nos tecidos de 552 ovelhas estudadas, embora o isolamento de *T. gondii* tenha sido feito em 27 amostras por inoculação em camundongos. Garcia et al 2006 também não encontraram cistos de *T. gondii* em 98 amostras de tecidos de porcos experimentalmente inoculados com a cepa avirulenta VEG, embora o parasito tenha sido isolado por ensaio em camundongos. Mesmo em animais de pequeno porte, o encontro de cistos de *T. gondii* nos tecidos pode ser dificultado pela baixa quantidade dos mesmos. Dubey et al 2005a relataram a necessidade de se examinar até um quarto do cérebro de certos camundongos para que fosse possível o encontro de cistos teciduais. Por certo, a densidade de cistos na amostra é fato relevante para o achado de tais estruturas através de análises histológicas. Kuticic & Wikerhauser 2000 encontraram cistos de *Toxoplasma* em apenas três das 716 amostras de camundongos inoculados com órgãos de galinhas. Enquanto que Sreekumar et al 2003 não encontraram cistos de toxoplasma nas 133 amostras analisadas de camundongos igualmente inoculados com órgãos de galinhas. Dubey et al 2006a também descreveu o encontro de pouquíssimos cistos nas amostras de 94 camundongos soropositivos para toxoplasmose.

No presente estudo, estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii* foram encontradas majoritariamente em amostras de cérebro tanto de aves como de camundongos, da mesma forma, dois dos isolados obtidos foram

oriundos de amostras de cérebro enquanto apenas um de amostras de coração, estes dados reforçam o conceito geral que *T. gondii* é um organismo neurotrópico, entretanto este é baseado em estudos desenvolvidos em camundongos e também no fato de seres humanos poderem desenvolver neurotoxoplasmose severa (Dubey et al 2004). Porém estudos adicionais realizados em outros animais assintomáticos têm questionado tal conceito. Jacobs & Melton 1966 isolaram Toxoplasma de ovários e músculo das pernas de galinhas de Maryland (USA), mas nenhum parasito foi isolado do cérebro de tais aves. Mais recentemente Dubey et al 2004 isolou *Toxoplasma* de 10 galinhas no Peru, todos os isolados foram obtidos do coração das aves enquanto que os inóculos dos cérebros destas, não resultou em isolamento.

Os camundongos que permaneceram assintomáticos foram sacrificados após 60 dias e seu soro analisado através da RIFI objetivando o encontro de imunoglobulinas das classes G e M. Dos 100 grupos, em 11 foi possível à detecção de anticorpos anti *T. gondii* em pelo menos um dos camundongos inoculados. Em apenas uma amostra foram encontradas imunoglobulinas da classe M, mas o baixo título (1:8) e o fato de tal anticorpo ter sido encontrado no soro de apenas um camundongo, sugere tratar-se de um resultado falso positivo. A negatividade dos soros estudados pode estar diretamente ligada ao tempo pós-infecção que estes foram analisados. Durante a infecção toxoplásmica, as imunoglobulinas da classe M são as primeiras a surgirem por volta do quinto dia, posteriormente surgem as da classe G, então gradativamente os títulos de IgM vão diminuindo até desaparecerem completamente restando apenas a IgG. Devido a este fato, a IgM é considerada característica de infecção aguda em curso. Handman & Remington 1980 demonstraram através de infecções experimentais em camundongos que os títulos de IgM sofrem queda considerável por volta do 28º dia pós-infecção. Todos os animais utilizados no presente estudo foram sacrificados após 60 dias de inoculação, sendo bem provável que este período de tempo tenha propiciado o desaparecimento da IgM do soro dos camundongos.

Em mamíferos, a IgG anti *T. gondii* pode permanecer em títulos detectáveis por provavelmente toda a vida do hospedeiro, conferindo desta forma imunidade protetora (Kawazoe 2003). Entretanto neste estudo, os títulos encontrados nos soros dos camundongos não foram superiores a 1:32 reforçando a probabilidade de existir uma baixa densidade de parasitos nos tecidos inoculados. Em estudo desenvolvido por Sreekumar et al 2003 que contou com a inoculação de 186 amostras de galinhas soropositivas no MAT, todos os camundongos permaneceram soronegativos. Paradoxalmente, o bioensaio em gatos das amostras de aves negativas no MAT, propiciou a obtenção de cinco isolados de *T. gondii.*

Os isolados obtidos no presente estudo (33 A, 33 B e 32 A) foram submetidos a estudo de virulência para camundongos através de inóculos com diferentes concentrações de taquizoítos. Classicamente o *T. gondii* tem sido classificado em três linhagens distintas chamadas tipos I, II e III. Estas apresentam marcantes diferenças na virulência para camundongos, a linhagem do tipo I possui dose letal absoluta (LD_{100}) com um único parasita viável, sendo chamada de linhagem virulenta, enquanto que as linhagens II e III possuem dose letal de 50% (LD_{50}) em inóculos iguais ou maiores que mil parasitas, estabelecendo facilmente infecção crônica.

Entretanto diversos relatos têm-se acumulado na literatura de cepas de *T. gondii* genotipadas como pertencentes a uma das três linhagens, com comportamento atípico. Dubey et al 2002 relatam a virulência para camundongos de cepas posteriormente genotipadas como pertencentes ao tipo III, reconhecido como avirulento para estes animais. Dubey et al 2003a também relata a sobrevivência de camundongos inoculados com cepas que posteriormente foram classificadas como pertencentes ao tipo I, considerado altamente virulento. De forma semelhante Ferreira et al 2001 relata o comportamento atipicamente virulento de uma cepa pertencente ao tipo III. A virulência do *T. gondii* em camundongos, depende de vários fatores incluindo o estágio do parasita inoculado, a rota de inoculação, a dosagem de parasitas, o tipo de animal utilizado e a cepa do parasita (Dubey et al 2002). Alguns autores propõem que sucessivas

passagens em camundongos possam provocar o aumento da virulência de cepas de *T. gondii.* Jacobs & Melton 1954 e Dubey 1974 descreveram substancial aumento da virulência em cepas primariamente avirulentas depois de algumas passagens em camundongos.

Por outro lado Grigg et al 2001, propuseram que a virulência das cepas seja oriunda de um alelo no genoma, desta forma as sucessivas passagens em camundongos nunca provocariam aumento significativo na virulência destas. Os esclarecimentos destes pontos obscuros necessitam de maiores estudos, sendo preconizados principalmente aqueles que utilizam vários marcadores genéticos para definir a linhagem.

Frente a este quadro, o estudo da virulência de isolados de *T. gondii* para camundongos através de curva de parasitemia deve ser considerado com cautela e apenas como indicativo da linhagem.

Neste estudo dos três isolados, dois foram 100% letais para camundongos a partir de concentração de mil taquizoítos e um a partir de dez mil taquizoítos, nas concentrações menores a letalidade caiu para níveis diferentes entre os três isolados. Estes resultados podem sugerir a impossibilidade dos isolados pertencerem ao tipo I, visto que teoricamente esta linhagem é fatal para camundongos mesmo na concentração de apenas um taquizoíto (Ferreira et al 2001). Desta maneira os isolados pertenceriam ao tipo II ou III, que são considerados avirulentos. Entretanto como discutido acima, o resultado obtido com este estudo de virulência pode tão somente sugerir a provável linhagem dos isolados, a confirmação só pode ser obtida através de estudos moleculares, preferencialmente com múltiplos marcadores genéticos.

7- CONCLUSÕES

1- A soroprevalência de anticorpos anti *T. gondii* nas amostras de “galinhas caipiras” comercializadas em feiras livres na cidade de Goiânia foi de 50%;
2- O isolamento do parasita obteve sucesso a partir de amostras de aves com os maiores títulos de anticorpos;
3- Foram encontradas estruturas morfologicamente compatíveis com cistos de *T. gondii* em cortes de órgãos tanto de aves como de camundongos;
4- Ocorreu a soroconversão de diversos camundongos que permaneceram assintomáticos durante o estudo;
5- Não foram encontradas evidências da presença de *T. gondii,* em amostras de aves consideradas soronegativas.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aganda AO, Belino ED 1984. Toxoplasmosis in local breed of chicken in Zaria, Nigeria *Intl J Zoonosis*11: 170-172.

Ajzenberg D, Banus AL, Tibayrenc M, Darde ML 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol*. 32: 27-38.

Alexander J, Hunter CA 1998. Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chem. Immunol*. 70: 81–102.

Amassari A, Murri R, Cingolani A, de Luca A, Antinori A 1996. AIDS- associated cerebral toxoplasmosis:an update on diagnosis and treatment. In: Gross U *Toxoplasma gondii*, Springer-Verlag, Berlin. p. 209-222.

Anthuber M, Sudhoff F, Schuetz A, Kenkes BM 1991. Donor transmitted infections in heart transplantation – HIV, CMV and toxoplasmosis. *Transplant Proc* 23: 2634–2635.

Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP 1998. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J Parasitol*. 84: 438-440.

Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoft C, Schwantje H, Ribble CS 1999. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect*.122: 305-315.

Araujo FAP, Souza WJS 1997. Antibody response against *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa) measured by indirect fluorescent antibody technique in pigs

naturally infected in the area of Great Erechim, RS, *Brazil. Arq Fac Vet UFRGS* 25: 75-83.

Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréfice F, Addiss DG, 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State. Brazil *Emerging Infect. Dis.* 9: 55–62.

Barbosa AJA 1988. As técnicas de imunoperoxidase no estudo da etiologia das doenças infecciosas e parasitárias. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 21: 1-6.

Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B 1999. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis* 31: 305-309.

Beringer T 1992. Ist die Toxoplasmose-Diagnostik im Rahmender Schwangerschaftsvorsorge sinnvoll? *Geburtsh Frauenheilkd*. 52:740-741.

Bhopale GM 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis* 26: 213–222

Boch J, Rommel M, Janitschke K 1964. Beitrage zur Toxoplasmose des Schweines. II. Untersuchungen von Schlachtschweinen auf Toxoplasma-Infektionen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 77: 244-247.

Boothroyd JC, Grigg ME 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opi Microbiol* 5: 438-442.

Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350: 173–177.

Burnett AJ, Short SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR 1998. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* 105: 1032-1037.

Cabannes A, Lucchese F, Hernandez JC 1997. Enquéte séroépidémiologique sur *Toxoplasma gondii* chez les ovins, bovins et félins dans le département de la Gironde. *Bull Soc Francà. Parasitol*.15: 11-22.

Camargo ME 2001. Toxoplasmose. In: A Ferreira and SLM Ávila, Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Guanabara-koogan, Rio de Janeiro, 2º edição. p 278-287.

Cassamagnaghi A, Bianchi Bazerque A, Scelza R, Ferrando H 1977. La toxoplasmosis. Su incorporación en la patolog´ýa Uruguaya. *An. Fac. Veterinaria* (Uruguay) 1: 27–47.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W 2000. Sources of Toxoplasma infection in pregnant women: a European multicentre case-control study. *Br Med J* 15: 142-147.

Couvreur J, Thulliez P 1996. Toxoplasmose acquise a localisation oculaire ou neurologique. *Presse Med.* 25: 438–442.

Cremers FXMM 1969. De waarde van de Sabin±Feldmanreactie voor de diagnostiek van toxoplasmose bij het verken, rund en schaap. *Tijdschr Diergeneeskd* 94: 695-698

Da Silva DS 2003. Caracterização parasitologica e genética de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas domésticas (*Gallus domesticus*) nos municípios de Campos dos Goytacazes, Conceição de Macabú e Carapebus/RJ.

Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense-Campos dos Goytacazes- Rio De Janeiro. 2003.

Da Silva AV, Langoni H 2001. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol* 97: 191-198.

Darde Ml, Bouteille, B, Pestre-Alexandre M 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J parasitol* 78: 786-794.

Denkers EY, Gazzinelli RT 1998. Regulation and function of T cellmediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol.Rev*. 11: 569–588.

Denkers EY, Sher A, Gazzinelli RT 1993. CD8+ T-cell interactions with *Toxoplasma gondii:* implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. *Res Immunol*. 144(1): 51-57.

Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Bennouna S 2004. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. *Int J Parasitol* 34: 411–421.

Denkers EY, Scharton-Kersten T, Barbieri S, Casper P, Sher A 1996. A role for CD4 + NK T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8 + effector function against intracellular infection. *J Exp Med.* 184: 131.

Desmonts G 1982. Toxoplasmose acquise de la femme enceinte: estimation du risque de transmission du parasite et de toxoplasmose congénitale*. Lyon Méd*. 248:115-123.

Desmonts G, Couvreur J 1974. Congenital toxoplasmosis. *New engl j Med*. 290: 1110-1116.

Desmonts G, Remington JS 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specifity. *J. Clin. Microbiol*.11: 562-570

Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M 1965. Etude epidemiologique sur la toxoplasmose: l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la frequence de l'infectin humaine. *Rev Fr Etud Clin Biol* 10: 952–58.

Desmonts G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M. 1985. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1: 500-504.

Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJF, Larivière M 1992. Toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis* 15: 267–270

Dietrich U, Maschke M, Dorfler A, Prumbaum M, Forsting M 2000. MRI of intracranial toxoplasmosis after bone marrow transplantation. *Neuroradiology* 42: 14-18.

Drobeck HP, Manwell RD, Bernstein E, Dillon RD 1953. Further studies of toxoplasmosis in birds. *Am. J. Hyg*. 58: 329–339.

Dubey JP 1977. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocysti* and others tissue cyst-forming coccidian of man and animals. In: JP kreier, Parasitic Protozoa, Academic Press, New York, p 101-237.

Dubey JP 1981. Epizootic toxoplasmosis associated with abortion in diary goats in Montana. Veterinary Medical Association 178: 661-670.

Dubey JP 1994. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*. 205:1593-1598.

Dubey JP 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of diferent strains of *Toxoplasma gondii. J Euk Microbiol* 44: 592:602

Dubey JP 1998a. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int j parasitol* 28: 1019-1024.

Dubey JP 1998b. Refinement of pepsine digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol* 74: 75-77.

Dubey, JP 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol*. 87: 215–219.

Dubey JP 2002. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol* 106: 121–153.

Dubey JP 2004. Toxoplasmosis- a waterborne zoonosis. *Vet parasitol* 126: 57-72.

Dubey JP, Beattie CP 1988. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Fl:Crc Press, Pag:1-220.

Dubey JP, Frenkel JK 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool*. 19: 155–177.

Dubey JP, Frenkel JK 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of Toxoplasma cysts. *J Protozool* 23: 537-546

Dubey JP, Kirkbride CA 1989. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *J Am Vet Med Assoc*.195: 1715-1716.

Dubey JP, Odening K 2001. Toxoplasmosis and related infections. In: Samuel B, Píbur M, Kocan AM *Parasitic Diseases of Wild Animals*, Iowa State University Press, Ames. p 78–519.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA 1998a. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev*. 11: 267–299.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK 1970. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 56: 447–456.

Dubey JP, Morales ES, Lehmann T 2004b. Isolation and gonotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J Parasitol*. 90: 411-413.

Dubey JP, Graham DH, Da Silva DS, Lehman T, Bahia-Oliveira LM 2003a. *Toxoplasma gondii* isolates of free-range chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype and oocyst sheeding by cats. *J parasitol* 89: 851-853

Dubey JP, Ruff MD, Wilkins GC, Shen SK, ,Kwok OCH 1994b. Experimental toxoplasmosis in pheasants (*Phasianus colchicus*). *J. Wildl. Dis.* 30: 40–45.

Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OCH, Blixt JA 1997. Oocys- induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity and stage conversion in mice fed *Toxoplasma*
gondii oocysts. *J Parasitol* 83: 870-872.

Dubey JP, Edelhofer R, Marcet PL, Vianna MCB, Kwok OCH, Lehmann T 2005a. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria . *Vet Parasitol* 133(4): 299-306.

Dubey JP, Patitucci AN, Suc C, Sundar N, Kwok OCH , Shen SK 2006a. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Vet Parasitol* 140: 76–82.

Dubey JP, Ruff MD, Kwok OCH, Shen SK, Wilkins GC, Thulliez P 1993b. Experimental toxoplasmosis in Bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *J. Parasitol*. 79: 935–939.

Dubey JP, Camargo ME, Ruff MD, Wilkins GC, Shen SK, Kwok OCH, Thulliez P, 1993a. Experimental toxoplasmosis in turkeys. *J. Parasitol*. 79: 949–952.

Dubey JP, Goodwin MA, Ruff MD, Kwok OCH, Shen SK, Wilkins GC, Thulliez P 1994a. Experimental toxoplasmosis in Japanese quail. J. *Vet. Diagn. Invest*. 6: 216–221

Dubey JP, Goodwin MA, Ruff MD, Shen SK, Kwok OCH, Wilkins GL, Thulliez P 1995. Experimental toxoplasmosis in chukar partridges (*Alectoris graeca). Avian Pathol*. 24:
95–107.

Dubey JP, Levy MZ, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Dahl E, Thulliez P, Lehmann T 2004a. Tissue distribuition and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru*. J Parasitol*. 90: 1015-1018.

Dubey JP, Jorge E, Gomez-Marin E, Bedoya A, Lora F, Kwok OCH, Shen SK, Marcet PL, Lehmann T 2005b. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma*

gondii isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Vet Parasitol* 134: 67-72.

Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudêncio L, Sreekumar C, Vianna MCB, Lehmann T 2003b. characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Paraná, Brazil. *Vet Parasitol* 117: 229–234

Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AHH, Farias NAR, Ruas JL, dos Santos TRB, Cavalcante GT, Kwok OCH, Suf C 2007. Biologic and genetic comparison of Toxoplasma gondii isolates in free-range chickens from the northern Para´ state and the
southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet Parasitol* 143: 182–188.

Dubey JP, Vianna MC, Sousa S, Canada N, Meireles S, Correia da Costa JM, Marcet PL, Lehmann T, Darde ML, Thulliez P 2006b. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Portugal. *J Parasitol*. 92: 184-186.
.
Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, Nishi SM, Shen SK, Kwok OCH, Hill DE, Thulliez P 2002. Biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chicken (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Intl J Parasitol* 32: 99-105.

Dubey JP, Zarnke R, Thomas NJ, Wong SK, Van Bonn W, Davis JW, Ewing R, Mense M, Kwok OCH, Beckmen KB, Romand S, Thulliez P. 2003c. *Toxoplasma gondii, Neospora caninum, Sarcocystis, neurona, and Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol*. 116: 275–296. 12

Farrel RL, Docton FL, Chamberlain DM 1952. Toxoplasmosis I. Toxoplasma isolated from swine. *Am J. Vet. Res*. 13: 181-185.

Ferguson DJ 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra?. *Trends Parasito*l. 18: 355–359.

Fernandes WJ, Barbosa W 1972. Toxoplasmose em Goiás. Comparação dos resultados da reação de Sabin-Feldman em investigação clínica e epidemiológica. *Rev Patol Trop* 1: 29-38.

Ferreira AM; Martins MS; Vitor RWA 2001. Virulence for Balb-c mice and antigenic diversity of eight Toxoplasma gondii strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite* 8:, 99-105.

Filisetti D, Candolfi E 2004. Immune response to Toxoplasma gondii. *Ann Ist Super Sanità* 40: 71-80.

Fleck DG 1989. Annotation: diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 42: 191-193.

Frenkel JK 1996. Toxoplasmose. In: R Veronesi & R Focaccia, Tratado de Infectologia, Atheneu, São Paulo, p. 1290-1305.

Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M 1975. Soil survival of Toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am.J. Trop. Med. Hyg*. 24: 439–443.

Frenkel JK, Hassanein KM, Hassanein RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez, R 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a 5 year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 458–468.

Gagne SS 2001. Toxoplasmosis*. Prim Care Update Ob/Gyns*. 8: 122-126.

Garcia JL, Gennari SM, Machado RZ, Navarro IT 2006. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histophatology and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Exp Parasitol* 113(4): 267-71

Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, de Oliveira RC 1999. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e case de propriedades rurais do municipio de Jaguapita, Estado do Paraná, Brasil. Ciência Rural 29: 99-104.

Gavrilescu LC, Denkers EY, 2001. IFN-_ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol*. 167: 902–909.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A 1993. Interleukin-12 is required for T lymphocyte independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T Cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci*. 90: 6115–9.

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC 2001. Success and virulence in Toxoplasma as the result of sexual recombination between two distincts ancestries. *Science* 294: 161-165.

Guerina N, Hsu H-W, Meissner H 1994. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N Engl J Med* 330: 1858–1863.

Guimarães AM, Ribeiro MFB, Lima JD, de Almeida TMB 1992. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 44: 69-71.

Hall SM, Pandit A, Golwilkar A, Williams TS 1999. How do Jains get Toxoplasma infection? *Lancet* 354: 486-487.

Handmant E, Remington JS 1980. Antibody responses to Toxoplasma antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infec Immun* 29: 215-220.

Hauser W, Sharma S, Remington J 1983. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*.131(1):458-63.

Honore S, Couvelard A, Garin YJ, Bedel C, Henin D, Dared ML, Derouin 2000 genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients. *Pathol biol* 48: 541-547.

Howe DK, Sibley DL 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172: 1561–66.

Howe DK, Summers BC, Sibley LD 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun*. 64: 5193–5198.

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol*. 35: 1411–1414.

Hunter C, Subauste C, Remington J 1994. The role of cytokines in toxoplasmosis. *Biotherapy*. 7: 237-47.

Hutchison WM 1965. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 206: 961-962.

Inagaki ADM 1997. Toxoplasmose e gravidez . Dissertação de mestrado-Universidade Federal De São Paulo, São Paulo, 1997.

Isaac-Renton J, Bowie WR, King A 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl Environ Microbiol*. 64: 2278-2280.

Ito S, Tsunoda K, Shimada K, Taki T, Matsui T. 1975. Disinfectant effects of several chemicals against Toxoplasma oocysts. *Jpn. J. Vet. Sci*. 37: 229–234.

Jacobs l, Melton ML 1954. Modification in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 3: 447-457.

Jacobs l, Melton ML 1966. Toxoplasmosis in chickens. *J Parasitol* 52: 1158-1162.

Jacobs l, Remington JS, Melton ML 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii. J Parasitol* 46: 11.

Janitschke K 1999. Pranatale ubertragung der toxoplasmen Von der mutter auf das kind. *bundesgesundheitsbl – gesundheitsforsch – gesundheitsschutz* 42: 548-52

Janku J 1923. Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu zœluté skvrny v oku normálneœ velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitu v sýtnici. Cœ as Lék C ésk;39-43:1021-7,1054-9,1081-5,1111-5,1138-44.

Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A 1972. Development of Toxoplasma oocysts in neotropical felidae. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 21: 512–517.

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

Jones TC, Kean BH, Kimball AC 1969. acquired toxoplasmosis. *NY State J Med* 69: 2237-2242.

Junqueira LCU. Técnicas básicas de citologia e histologia. 1º edição, São Paulo: Santos. 1983.

Kaneto CN, Costa AJ, Paulillo, AC, Moraes FR, MurakamI TO, Meirelles MV , 1997. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet Parasitol* 69: 203-210.

Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J 1996. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 144: 405-412.

kasper and Boothroyd, *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: Immunology and molecular biology of parasitic infections. 3º edição ed. Blackwell scientific publications. Edited by Kenneth s warren, 1992.

Kasper L, Khan I, Ely K, Buelow R, Boothroyd JC1992. Antigenspecific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii* infected peritoneal macrophages. *J Immunol*. 148(5): 1493-8.

Kawazoe U 2003. *Toxoplasma Gondii*. In DP Neves, Parasitologia Humana, Atheneu, São Paulo. p 147-156.

Kraube T, Straube W, Wiersbitzky S, Hitz V, Kewitsch A 1993. Toxoplasmose screening
in der Schwangerschaft ein Pilotprogramm im Nordosten Deutschlands. *Geburtshilfe Frauenheilkd*;53: 613-6188.

Kusne S, Dummer JS, Ho M, Whiteside T, Rabin BS, Makowka L, Esquivel CO, Starzl TE 1986. Self limited Toxoplasma parasitemia after liver transplantation. *Transplantation* 44: 457–458.

Kuticic V, Wikerhauser T 2000. A survey of chickens for viable toxoplasms in Croatia. *Acta Vet Hung.* 48: 183-185.

Lebech M, Andersen O, Christensen NC 1999. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet*; 353: 1834–1837.

Levaditi C, Schoen R, Sanchis Bayarri V 1928. L'encéphalomyélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *C R Séances. Soc Biol Fil*;99:37±40.

Lindberg RE, Frenkel JK 1977. Cellular immunity to Toxoplasma and Besnoitia in hamsters: specificity and the effects of cortisol. *Infect Immun* 15(3): 855-62.

Lindsay DS, Smith PC, Blagburn BL, 1994. Prevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from wild turkeys in Alabama. *J Helminthol Soc Wash* 61: 115–117.

Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol* 73: 27–33.

Lindsay DS, Collins MV, Mitchell SM, Cole R, Flick G, Wetch CN, Lindquist A, Dubey JP 2003. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in sea water. *J Eukaryot Microbiol* 50: 687–688.

Lindsay DS, Collins MV, Mitchell SM, Wetech CN, Rosypal AC, Flick GJ, Lindquist A, Dubey JP 2004. Survival of *Toxoplasma gondii oocysts* in eastern oysters (*Crassostrea virginica). J Parasitol* 90: 1053–1056.

Literák I, Hejl´ý¡cek K, Nezval J, Folk C 1992. Incidence of *Toxoplasma gondii* in populations of wild birds in the Czech Republic. *Avian Pathol* 21: 659–665.

Lucas SRR, Hagiwara MK, de Souza Loureiro V, Ikesaki JYH, Birgel EH 1999. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41: 221-224.

Ludlan GB, Beattie CP 1963. Pulmonary toxoplasmosis. *Lancet*: 1136-1138.

Luft BJ 1989. *Toxoplasma gondii.* In: PD Walzer & RM Genta, Parasitic infections in the compromised host, Marcel Dekker editors, New York. p 179-279.

Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS 1984. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J Am Med Assoc*. 252: 913-917.

Lukes¡ova´ D, Litera´k I 1998. Shedding of Toxoplasma gondii oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 74: 1

Lundén A, Uggla A 1992. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol* 15: 357-363.

Mcallister MM 2005. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical toxoplasmosis”. *Vet Parasitol* 132: 241-247.

McDonald JC, Gyorkos TW, Alberton B, MacLean JD, Richer G, Juranek D 1990. An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Quebec. *J Infect Dis* 161: 769-774.

Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP 1972. Oral infections with toxoplasma cysts and oocysts in felines, others mammals and birds. *J parasitol* 84: 639-641.

Miller MA, Gardner IA, Kreuder C, Paradies DM, Worcester KR, Jessup DA, Dodd E, Harris MD, Ames JA, Packham AE, Conrad PA 2002. Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int J Parasitol* 32: 997–1006.

Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *The lancet* 363: 1965-1974

Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley, LD 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167: 4574–4584.

Mosmann TR, Moore KW 1991. The role of IL-10 in cross regulation at TH1 and TH2 responses. *Immunol Parasitol Today* 12: 49–53.

Neves JM, Nascimento LB, Ramos JGL, Martins-Costa SH 1994. Toxoplasmose na gestação. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 16: 197-202.

Nicolle C, Manceaux L 1908. Sur une infection a¡ corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci* 147: 763-766.

Nicolle C, Manceaux L 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci*.148: 369-372.

Nóbrega MC 1998. Ocorrência de toxoplasmose em gestantes e em seus recém nascidos, atendidos no hospital das clínicas da UFPE. dissertação de mestrado-Universidade Federal De Pernambuco, Recife, 1998.

Ocholi RA, Kalejaiye JO., Okewole PA 1989. Acute disseminated toxoplasmosis in two captive lions (*Panthera leo*) in Nigeria. *Vet Rec* 124: 515–516.

Parenti E, Cerruti Sola S, Turilli C, Corazolla S 1986. spontaneous toxoplasmosis in canaries (*Serinus canaria*) and other small passarine cage birds. *Avian pathol* 15: 183.

Parker JS, Roberts CW, Alexander J 1991. CD8 + T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin Exp Immunol* 84: 207–12.

Paul M 1998. Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis. Przegl Epidemiol 52: 447-454.

Penna HFJ, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM 2005. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice and biologic and molecular characterization. *Res Vet Sci* 81(1): 58-67.

Perkins ES 1973. Ocular toxoplasmosis. *Br. J. Ophthalmol*. 57: 1–174

Petithory JC, Reiter-Owona I, Berthelot F, Milgram M, De Loye J, Petersen E 1996. Performance of European laboratories testing serum samples for *Toxoplasma gondii European Journal Of Clinical Microbiology Infectious Disease* 15: 45-49.

Pfefferkorn ER, Rebhun S, Eckel M 1986. Characterization of an indoleamine 2,3 dioxygenase induced by gamma- interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res* 6(3):267-79.

Pinkerton H, Henderson RG 1941. Adult toxoplasmosis: a previously unrecognized disease entity simulating the typhus-spotted fever group. *J Am Med Assoc* 116: 807-814.

Pinkerton H, Weinman D 1940. Toxoplasma infection in man. *Arch Patho*l 30: 374-392.

Porter SB, Sande M 1992. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med* 327: 1643–48.

Remington JS 1974. Toxoplasmosis in the adult. *Bull NY Acad Med* 50: 211-227.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G 2001. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Klein J eds., Philadelphia. P. 205–346.

Renoult E, Chagbot F, Aymard B, Hestin D, Delorme N, Biava MF, Kures L, Kessler M 1991. Generalized toxoplasmosis in two renal transplant recipients which received a kidney from the same donor. *Rev Infect Dis* 13: 180–181.

Roberts F, McLeod R 1999. Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Parasitol Today* 15: 51-57.

Roger F, Prunaux O, Guignard A 1991. La toxoplasmose bovine et caprine a l'Ile de Réunion: résultats d'une enquete sérologique. *Rev Méd Vet* 142: 143-146.

Ruiz A, Frenkel, JK, 1980a. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 29: 1161–1166.

Ruiz, A., Frenkel, J.K., 1980b. Toxoplasma gondii in Costa Rican cats. *Am J Trop Med Hyg 29, 1150–1160.*

Sabin AB, Feldman HA. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma). Science* 108: 660-603.

Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF 1982. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *J Am Med Assoc*. 248:1728-1732.

Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21(10).

Schereiber RD, Feldman HA 1980. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma gondii* as the classical complement pathway. *J Infect Dis* 141: 366-369.

Schluter D, Lohler J, Deckert M, Hof H, Schwendemann G 1991 Toxoplasma encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of Toxoplasma antigen, infiltrates and major histocompatibility complex geneproducts. *J Neuroimmunol* 31(3):185-98.

Sedlák K, Literák I,Vitula F., Benák J, 2000. High susceptibility of partridges (*Perdix perdix*) to toxoplasmosis compared with other gallinaceous birds. *Avian Pathol*. 29: 563–569.

Seineke P 1996. Seropravalenz von antikorpern gegen *Toxoplasma gondii* bei Schafen, Ziegen und Schweinen in Niedersachsen. Thesis Dr vet med, Hannover.

Sher A, Sousa CR 1998. Ignition of the type I response to intracellular infection by dendritic cell derived interleukin-12. *Eur Cytokine Netw* 9: 65–8.

Shirley MW. 1997 Vaccines against animal coccidioses. Working group 4, sarcocystiosis, toxoplasmosis, neosporosis, Luxembourg: *Office for Official Publications of the European Communities.*

Sibley LD 2003. Recent origins among ancient parasites. *Vet Parasitol* 115: 185–198.

Sibley LD, Boothroyd JC 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359: 82–85.

Speer CA, Dubey JP 1998. Ultrastructure of early stages of infection in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts.*Parasitology* 116: 35.

Splendore A 1908. Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesione anotomiche dùne malattiache ricorda in moltoprinti il kalazar dellùomo: notapreliminaire. *Rev Soc Sci* 3: 109-112.

Sreekumar C, Graham DH, Dahl E, Lehmann T, Raman M, Bhalerao DP, Vianna MC, Dubey JP 2003. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Índia. *Vet Parasitol* 118: 187-194.

Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci* 99: 10753–10758.

Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD 2003. Recent expansion of Toxoplasma through enhanced oral transmission. *Science* 299: 414–16.

Subauste C, Koniaris A, Remington J 1991. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. *J Immunol*. 147(11): 3955-9.

Sukthana Y 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol* 22: 137-142.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii:* from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258.

Theologides A, Kennedy BJ 1969. Toxoplasmosis myocarditis and pericarditis. *Am J Med* 47: 169-174.

Tsunematsu Y, Shioiri K, Kusano N 1964. Three cases of lynphadenopathy toxoplasmic with special reference to the application of fluorescent antibody technique for detection of Toxoplasma in tissue. *Jpn J exp Med* 34: 217-230.

Van Knapen F, Kremers AFT, Franchimont JH, Narucka U 1995. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in the Netherlands: towards an integrated control of livestock production.*Vet Q* 17: 87-91.

Vickers MC, Hartley WJ, Mason RW, Dubey JP, Schollam L 1992. Blindness associated with toxoplasmosis in canaries. *J Am Vet Med Assoc* 200: 1723–1725.

Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte´ H, Inglard JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *App Environ Microbiol* 70: 4035–4039.

Vischer TL, Bernhein C, Engelbrecht E 1967. Two cases of hepatitis due to *Toxoplasma gondii*. Lancet 11: 919-920.

Yano A, Aosai F, Ohta M, Hasekura H, Sugane K, Hayashi S 1989. Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. *J Parasitol* 75(3): 411-6.

Yap GS, Sher A 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii:* initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201: 240–247.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo