

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**Infecção por *Toxoplasma gondii* em rebanhos exclusivos
de criação de ovinos e consorciados com bovinos
e a contaminação ambiental por oocistos**

PRISCILLA SCHOEPS FELICIO

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico,
da Agência Paulista de Tecnologia dos
Agronegócios, para obtenção do título de
Mestre em Sanidade Animal, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Orientadora: Prof. Dra. Margareth Elide Genovez

São Paulo

2010



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

PRISCILLA SCHOEPS FELICIO

Título: Infecção por *Toxoplasma gondii* em rebanhos exclusivos de criação de ovinos e consorciados com bovinos e a contaminação ambiental por oocistos.

Orientador(a): Margareth Elide Genovez

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade animal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr.(a): Margaret Elide Genovez

Instituição: Instituto Biológico de São Paulo

Prof. (a) Dr.(a): Lílian Gregory

Instituição: FMVZ USP

Prof. (a) Dr.(a): Rodrigo Martins Soares

Instituição: FMVZ USP

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca

Instituto Biológico

Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Felicio, Priscilla Schoeps

Infecção por *Toxoplasma gondii* em rebanhos exclusivos de criação de ovinos e consorciado com bovinos e a contaminação ambiental por oocistos / Priscilla Schoeps Felicio. -- São Paulo, 2010.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Margareth Elide Genovez

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal, Segurança alimentar e ambiental no Agronegócio

Versão do título para o inglês: Infection by *Toxoplasma gondii* in herds of sheep-farming exclusive or intercropping with cattle and the environmental contamination by oocysts.

1. *Toxoplasma gondii* 2. Oocistos 3. Ovinos 4. Bovinos 5. Água (Contaminação ambiental) 6. Solo (Contaminação ambiental) I. Genovez, Margareth Elide II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título

Dedicatória

Aos meus queridos pais (Sonia Maria e José Antônio), irmãos (Junior e Renato) e familiares sempre presentes.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Margareth Elide Genovez, pela orientação, amizade e inesgotável paciência;

À Comissão de Pós Graduação;

Aos corpo docente da Pós Graduação do Instituto Biológico por sempre garantir a qualidade do Curso;

Aos Pesquisadores científico:

- Eliana Monteforte Cassaro Villalobos, que me acolheu desde o início da minha vida profissional sempre orientando com muita paciência e benevolência;
- Maria do Carmo C. S. H. Lara pela total colaboração desde a fase inicial no desenvolvimento do projeto até a conclusão deste trabalho;
- Elenice Maria Sequetim Cunha pelas oportunas sugestões a fim corroborar na execução deste trabalho;
- Adriana Hellmeister de Campos Nogueira pelas incontáveis horas de colaboração para a concretização deste trabalho, sempre com muito bom humor;
- Daniela Pontes Chiebao pela amizade e, principalmente por sua colaboração desde fase de colheita de amostras até a finalização do trabalho;
- Fábio H. L. Gabriel por contatar os proprietários e auxiliar na colheita de amostras;
- Alessandra Figueiredo de Castro Nassar, pela orientação na realização das PCR's;
- Tatiana Evelyn Hayama Ueno pelo apoio em determinados procedimentos laboratoriais e pelo contato com o Instituto de Medicina Tropical, SP;
- Liria Hiromi Okuda pela realização de parte do PCR.

Aos médicos veterinários:

- Paulo Tomazella médico veterinário da casa da Agricultura de Piedade, SP, no contato junto aos proprietários dos animais para a realização da colheita das amostras;
- Eduardo Carvalho Marques pela amizade e auxílio em determinados procedimentos laboratoriais.

- Juliana Nunes Meca pelo fornecimento de algumas técnicas e principalmente por sua amizade.
- Pesquisadora Profa. Dra. Luciana Regina Meireles do Instituto de Medicina Tropical.

Aos Funcionários do Laboratório de Raiva e Encefalites:

- Márcia Regina, pela colaboração e presença continua nos momentos de descontração;
- Raquel Rosa e Rui, por colaborar, sempre que necessário.

Ao pessoal do Laboratório de Bacteriologia Geral e do Laboratório de Viroses dos Bovinos, em especial, à Nara Thiers.

E a todos os funcionários do Instituto Biológico de outros laboratórios que sempre procuraram me auxiliar da melhor maneira possível.

Aos colegas de Pós Graduação pelo convívio harmonioso e, especialmente, aos que sempre me apoiaram e incentivaram (Mariana Vaz, Marianne Oliveira e Luis Correzola).

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (processo n. 2008/55384-0) e pela concessão da bolsa de capacitação técnica nível III (processo n. 2009/02033-8).

RESUMO

FELICIO, P. S. Infecção por *Toxoplasma gondii* em rebanhos exclusivos de criação de ovinos e consorciado com bovinos e a contaminação ambiental por oocistos. Infection by *Toxoplasma gondii* in herds of sheep-farming exclusive or intercropping with cattle and the environmental contamination by oocysts. São Paulo, 2010, 46 f., dissertação Mestrado em sanidade animal, segurança alimentar e ambiental no agronegócio – Instituto Biológico de São Paulo.

A toxoplasmose, zoonose mundialmente difundida, destaca-se na espécie ovina, dentre as enfermidades parasitárias reprodutivas, como responsável por quadros de abortamento, mal-formação fetal e natimortalidade. O *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório, apresenta três estágios unicelulares infectantes do parasito os taquizoítos, os bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e os esporozoítos (contidos em oocistos). Nos ovinos, a infecção ocorre através da ingestão de oocistos presentes nos alimentos, solos e águas de superfície contaminadas. O presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência de toxoplasmose nos rebanhos ovinos e bovinos da região de Sorocaba-SP e determinar a presença de oocistos em amostras de solo e água pelo bioensaio em camundongos e PCR. Foram estudados 272 ovinos e 17 bovinos provenientes de quatro propriedades da Região de Sorocaba, sendo duas exclusivas de criação de ovinos e duas consorciadas com bovinos. Foi utilizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*. A pesquisa da presença de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas de bebida (águas de superfície) e de solo foi realizada através do bioensaio em camundongos (inoculados via intraperitoneal e pela via oral). Nos dias 0, 30 e 60 após a inoculação foram colhidas amostras de soro sanguíneo dos camundongos, e analisadas pela RIFI, para observação da soroconversão. Após 60 dias de inoculação os camundongos foram submetidos à eutanásia e os órgãos analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As amostras de água e de solo foram analisadas com a finalidade de detectar o DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR. Pela RIFI, das 272 amostras de soro de ovinos foram determinados 31,62% de animais sororeagentes, enquanto nos bovinos 94,12% foram sororeagentes. Das 13 amostras de água inoculadas em camundongos nove (69%) foram positivas pela PCR e das 10 amostras de solo cinco (50%) foram positivas pela PCR concordando com resultados positivos na RIFI realizada no soro dos camundongos inoculados. Com base nos resultados apresentados nas condições experimentais deste trabalho pode-se concluir que a toxoplasmose está presente nos quatro rebanhos ovinos examinados da região de Sorocaba. O consumo de águas e o pastejo dos animais em solos contaminados com oocistos de *Toxoplasma gondii* foram considerados como importantes fontes de infecção.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, oocistos, ovino, bovino, água e solo

ABSTRACT

FELICIO, P. S. Infection by *Toxoplasma gondii* in herds of sheep-farming exclusive or intercropping with cattle and the environmental contamination by oocysts Infecção por *Toxoplasma gondii* em rebanhos exclusivos de criação de ovinos e consorciado com bovinos e a contaminação ambiental por oocistos, São Paulo, 2010, 46 f., dissertação Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Instituto Biológico de São Paulo.

Toxoplasmosis, a worldwide spread zoonosis, stands out among the reproductive parasitic diseases in sheep as responsible for clinical features like miscarriage, fetal malformation and stillbirth. *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan, presents three infecting unicellular stages, the tachyzoites, the bradyzoites (contained in tissue cysts) and the sporozoites (contained in oocysts). In sheep, infection occurs through ingestion of oocysts from contaminated food, soil and surface water. The present study aimed to determine the occurrence of toxoplasmosis in sheep and cattle herds in Sorocaba-SP area and the presence of oocysts in samples of soil and water using mouse bioassay and PCR. 272 sheep and 17 cows from four farms in Sorocaba area were studied, being two of them exclusively sheep farms and the other two intercropped with cattle. Indirect immunofluorescence assay (IFA) was used to detect antibodies against *Toxoplasma gondii*. The research for the presence of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water (surface water) and soil samples was done through mouse bioassay (inoculated intraperitoneally and orally). On days 0, 30 and 60 after inoculation, blood serum mice samples were taken and analyzed by IFA, for seroconversion observation. After 60 days inoculation, all mice were euthanized and their organs were analyzed by polymerase chain reaction (PCR). The water and soil samples were analyzed in order to detect *Toxoplasma gondii* DNA through PCR. On IFA from 272 sheep serum samples, 31.62% of the animals sera were determined as positive, while 94.12% cattle sera were positive. *T. gondii* DNA was found in 9 (69%) of 13 inoculated water samples and there were 5 positives (50%) of 10 soil samples, with PCR. Based on the results presented in experimental conditions, it can be concluded that toxoplasmosis is present in all four sheep flocks examined. Water consumption and animal grazing on soils contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts were considered major sources of infection.

Key-words: *Toxoplasma gondii*, oocysts, sheep, cattle, water, soil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
DNA	Acido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay – ensaio imunoenzimático
FAO	Food na Agriculture Organization of the United Nation
g	grama
HCl	ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KCL	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4	fosfato de Potássio monobásico anidro
M	Molar
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
mL	mililitros
mM	milimolar
μM	micromolar
n.o	número
nm	nanomol
NaCl	Cloreto de sódio
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
NaHCO_3	bicarbonato de sódio
Na_2HPO_4	fosfato se sódio dibásico anidro

PBS	solução tamponada com fosfatos
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogênio
q. s. p.	quantidade suficiente para
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
RSF	reação de Sabin-Feldman
TE	tampão Tris-EDTA
UI	unidade internacional
UPA	Unidade de produção agropecuária

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Identificação dos rebanhos, seus respectivos sistemas de criação e número de animais, São Paulo, 2009. 14
- Tabela 2 - Frequência de rebanhos e de animais reagentes para anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* na reação de imunofluorescência indireta, em criações exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos, São Paulo, 2009. 24
- Tabela 3 - Título de anticorpos anti-*T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta de soro de camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e oral (VO) com amostras de águas de superfície colhidas nas propriedades com criações exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos – São Paulo, 2009. 27
- Tabela 4 - Título de anticorpos anti-*T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta de soro de camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e oral (VO) com amostras de solo colhidas nas propriedades com criações exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos – São Paulo, 2009. 28
- Tabela 5 - PCR dos órgãos dos camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e via oral (VO) com amostras de águas de superfície e de bebedouro. São Paulo, 2009. 30
- Tabela 6 - PCR dos órgãos dos camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e via oral (VO) com amostras de solo . São Paulo, 2009. 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de <i>Toxoplasma gondii</i>	07
Figura 2 - Frequência de animais reagentes e distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em dois rebanhos exclusivos de ovinos da região de Sorocaba, SP, 2009	25
Figura 3 - Frequência de animais reagentes e distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em dois rebanhos de ovinos consorciados com bovinos, da região de Sorocaba, SP, 2009	26
Figura 4 - Reação de imunofluorescência indireta -RIFI, Padrão Positivo (aumento 400X)	29
Figura 5 - Reação de imunofluorescência indireta -RIFI, Padrão Negativo (aumento 400X)	29
Figura 6 - Reação de imunofluorescência indireta - RIFI, Padrão Apical Negativo (aumento400X)	29

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FÍGURAS	XII
SUMÁRIO	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Seleção dos rebanhos	14
4.2. Identificação dos rebanhos	14
4.3. Fatores de risco para a presença de <i>Toxoplasma gondii</i> nos rebanhos	15
4.4. Colheita das amostras	15
4.4.1. Amostras clínicas	15
4.4.2. Amostras ambientais.....	15
4.5. Exames laboratoriais das amostras clínicas.....	16
4.5.1. Reação de imunofluorescência indireta.....	16
4.6. Exames laboratoriais das amostras ambientais	17
4.6.1. Detecção de oocistos de amostras de água de superfície e de bebedouros	17
4.6.2. Detecção de oocistos em amostras de solo	17
4.6.3. Reação em cadeia pela polimerase – PCR para detecção de DNA de <i>T. gondii</i> em amostras de água e solo.....	17
4.7. Bioensaio em camundongos	18
4.7.1. Colheita das amostras dos camundongos.....	19
4.7.1.1. Soro	19
4.7.1.2. Órgãos	20
4.7.2. Análises laboratoriais	20
4.7.2.1. Reação de imunofluorescência indireta dos soros dos camundongos.....	20

4.7.2.2. Reação em cadeia pela polimerase – PCR para detecção do <i>T. gondii</i> em órgãos de camundongos	20
4.8. Tratamento estatístico dos dados	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	33
CONCLUSÕES	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
7. Anexo I - Certificado de aprovação - CETEA- Comissão de ética na experimentação animal	47

1. INTRODUÇÃO

Segundo o último Censo Agropecuário realizado em 2006, o rebanho ovino e bovino, no Brasil foram estimados em cerca de 13,9 milhões e 169,9 milhões de animais (IBGE, 2006a). A região Nordeste contava com 7,7 milhões de ovinos e 26 milhões de bovinos, a região Norte detinha 474 mil ovinos e 31,2 milhões de bovinos, a região Centro-Oeste 867 mil ovinos e 53,8 milhões de bovinos, a região Sul era detentora de 3,9 milhões ovinos e 23,9 milhões de bovinos e a região Sudeste totalizava 763 mil cabeças de ovinos e 34,9 milhões de bovinos (IBGE, 2006b).

Em 1970, o estado de São Paulo, contava com efetivo animal de aproximadamente 98.126 ovinos e 9.110.633 bovinos; o qual nas últimas quatro décadas demonstrou crescente aumento atingindo 460.746 cabeças de ovinos e 10.209.204 bovinos (IBGE, 2006c) distribuídos em 11.027 e 124.612 estabelecimentos (IBGE, 2006d). A região de Sorocaba fulcro deste estudo conta com o montante de 11.513 ovinos e 238.052 bovinos, com aptidão de corte, de leite e mista, distribuído respectivamente em 187 e 4432 UPA's – Unidades de Produção Agropecuária, (SAA/CATI/IEA, 2008).

A consolidação da cadeia produtiva da ovinocultura no Brasil foi marcada por mudanças ocorridas nos últimos dez anos. Nesse período, a atividade ganhou atenção de governantes, técnicos e produtores e acarretou algumas transformações principalmente com a intensificação das pesquisas voltadas para produção de animais e beneficiamento de seus produtos, crescimento do nível de organização dos produtores, aumento da absorção das novas tecnologias, maior atuação dos agentes financeiros para facilitar o acesso ao crédito e, o mais importante, o aumento da demanda por produtos derivados de caprinos e ovinos (MEDEIROS *et al*, 2005; CARVALHO, 2007). Entretanto, apesar do impulso mercadológico, a produtividade da caprinovinocultura de corte no Brasil ainda é baixa. Uma das razões está no regime de manejo da exploração ainda obedecendo aos padrões de criação extensiva, com alta dependência da vegetação nativa, utilização de raças não especializadas, assistência técnica deficitária, baixo nível de organização e gestão da unidade produtiva e, sobretudo carente de controle sanitário efetivo, em alguns centros criatórios.

Na região Sudoeste paulista, a exploração dessas criações ocorre em sistema extensivo com a ingestão de volumosos (pastagem) que ainda é a principal fonte de alimentação dos rebanhos (NOGUEIRA; MELLO, 2005). A crescente expansão da ovinocultura no estado de São Paulo, atualmente bastante significativa, está principalmente relacionada à ovinocultura de corte, com estrutura e organização empresarial, em substituição às criações de subsistência.

O preciso diagnóstico parasitário é essencial para qualquer abordagem sanitária em ovinos e caprinos, caso contrário a criação dessas espécies torna-se inviável devido à baixa produtividade (JARDIM, 1996).

Na espécie ovina, a toxoplasmose, zoonose mundialmente estudada, destaca-se dentre as enfermidades parasitárias reprodutivas como responsável por quadros de abortamento, mal-formação fetal e natimortalidade (MALIK *et al.*, 1990)

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório (MONTROYA; LIESENFELD, 2004) com três estágios unicelulares infectantes do parasito: os taquizoítos, os bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e os esporozoítos (contidos em oocistos). Nos ovinos, a infecção ocorre através da ingestão de oocistos presentes nos alimentos (pastos e ração) e solos contaminados (PLANT¹ *et. al.*, 1974 *apud* OGAWA, 2003; COUTINHO² *et. al.*, 1982 *apud* OGAWA, 2003). Para Isaac-Renton *et. al.*, 1998, deve-se considerar ainda a possibilidade de disseminação de oocistos não esporulados através de águas de superfície.

A infecção humana por *Toxoplasma gondii* tem elevada prevalência no Brasil e ocorre pela ingestão de alimentos, principalmente, carnes cruas ou mal cozidas e água contaminadas por oocistos (TENTER; HECKROTH; WEISS, 2000; MEIRELES, 2001).

A importância do oocisto livre ou do cisto tecidual para a transmissão varia de acordo com a região, o grupo étnico e os hábitos alimentares de cada população. A água parece ter papel mais importante do que anteriormente imaginado, já que surtos relacionados a fontes de água contaminada têm sido freqüentemente relatados (DUBEY, 2004; TENTER; HECKROTH; WEISS, 2000).

Outras formas de transmissão menos comuns são o transplante de órgãos e a transfusão sanguínea (DUBEY, 1994). Nos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou transplantados submetidos à terapia imunossupressora, estima-se que de 10 a 30% dos pacientes com AIDS morram por toxoplasmose (TENTER; HECKROTH; WEISS, 2000; HILL; DUBEY, 2002).

Considerando-se a importância da toxoplasmose, tanto em seus aspectos sócio-econômicos quanto zoonóticos e de saúde pública, e o crescente interesse pela ovinocultura no estado de São Paulo, o presente trabalho poderá contribuir para um melhor entendimento da doença, particularmente no que se refere aos fatores de risco relativos às fontes de infecção, visando a proteção dos susceptíveis nestas criações.

¹ PLANT, J. W.; RICHARDSON, N.; MOYLE, G. G. *Toxoplasma* infection and abortion in sheep associated with feeding of grain contaminated with cat faeces. **Australian Veterinary Journal**, Artamon, v. 50, p. 19-21, 1974.

² COUTINHO, S. G.; LOBO, R.; DUTRA, G. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in rural area in Brazil. **Journal of Parasitology** Lawrence, v. 68, n. 5, p. 886-868, 1982.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A toxoplasmose é uma protozoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, classificado como coccídeo intracelular obrigatório, pertencente ao Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Família Sarcocystidae (HILL *et al*, 1994), o qual é capaz de infectar e se replicar no interior de qualquer célula nucleada de mamíferos ou aves (BLACK; BOOTHROYD, 2000), sendo amplamente prevalente em humanos e animais (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

O *Toxoplasma gondii*, inicialmente denominado *Leishmania gondii*, foi descoberto pelos parasitologistas franceses Charles Nicolle e Louis Hebert Manceaux (1908 *apud* COX, 2002)³, como parasito em um roedor africano (*Ctenodactylus gondii*), considerado seu hospedeiro e reservatório. No mesmo ano Splendore (1909 *apud* Cox, 2002)⁴, em São Paulo, descreveu a presença do parasito em coelhos e Samuel Taylor Darling (1909 *apud* Cox, 2002)⁵, observou-o em humanos. Em 1909, Nicolle e Manceaux⁶ (1909 *apud* Cox, 2002), renomearam o parasito para *Toxoplasma gondii* (*toxos* significa arco e *plasma* material germinativo ou seja organismo em forma de arco).

Os membros da família Sarcocystidae podem apresentar no seu ciclo evolutivo dois tipos de hospedeiros, o definitivo e o intermediário (não obrigatório). Nos hospedeiros definitivos, membros da família *Felidae*, comumente gatos domésticos, ocorrem as fases intestinal (entero-epitelial) e extra-intestinal (em outros tecidos epiteliais); enquanto que nos hospedeiros intermediários outras espécies de mamíferos e aves, existe apenas a fase extra-intestinal (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000). Por conta deste modelo de ciclo biológico o *T. gondii* é considerado polixeno e heteroxeno facultativo.

Nos hospedeiros definitivo e intermediário o *T. gondii* passa por duas fases assexuadas de desenvolvimento, na primeira os taquizoítos, multiplicam-se rapidamente no interior de diferentes tipos de células (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000) e, durante a segunda fase do desenvolvimento, resultam na formação de cistos teciduais (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000), em resposta à imunidade do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

³ NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. H. Sur une infection à corps de leishiman du gondi **CR Acad Sci**, 1908

⁴ SPLENDORE, A. Sur un nouve protozoaire parasite du lapin, deuxième note préliminaire. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 2, p. 462-465, 1909.

⁵ DARLING, S. T. Sarcosporidiosis: with report of a case in man. **Proc. Canal Zone Med. Assoc.** v. 1, p.141-152, 1909.

⁶ NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. H. Sur um protozoaire nouveau du gondi. **Arc. Inst. Pasteur** v. 2, p. 97-103, 1909

O ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* foi esclarecido quando foram identificados estágios sexuais no intestino delgado de gatos (ciclo enteroepitelial) e oocistos nas suas fezes (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970).

O *Toxoplasma gondii* apresenta três estágios infecciosos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998) nos hospedeiros definitivos: os taquizoítos (agrupados), bradizoítos (cistos teciduais) e esporozoítos (oocistos) enquanto que nos hospedeiros intermediários são encontrados apenas taquizoítos (agrupados) e bradizoítos (cistos teciduais) .

Os taquizoítos (endozoítos), bradizoítos (cistozoítos) e oocistos (esporozoítos) são ultraestruturalmente semelhantes diferindo em algumas organelas e corpúsculos de inclusão. Também são semelhantes entre si no ataque e penetração nas células dos hospedeiros igualmente a outros parasitos coccídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998).

Os taquizoítos possuem forma de semi-arco e medem de 4 a 8 μm de comprimento por 2 a 4 μ de largura (MONTROYA; LIESENFELD, 2004) são encontrados durante a fase aguda da infecção (BLACK; BOOTHROYD, 2000) em resposta à imunidade do hospedeiro, diferenciam-se em bradizoítos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos (cistozoítos), no interior dos cistos teciduais multiplicam-se lentamente. Os cistozoítos apresentam-se em diferentes tamanhos e, na sua forma recente, podem medir 5 micrômetros de diâmetro e conter apenas dois bradizoítos, enquanto que os mais antigos podem conter até 100 bradizoítos. No cérebro, os cistozoítos frequentemente são esferoidais e raramente alcançam 70 micrômetros de diâmetro; já os cistozoítos intramusculares podem atingir até 100 micrômetros (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998).

O cisto tecidual tem alta afinidade por tecido nervoso e muscular, com predomínio de localização no sistema nervoso central, nos olhos e na musculatura esquelética cardíaca; mais raramente encontrado em órgãos viscerais como pulmões, fígado e rins.

Os cistos teciduais são o estágio final do ciclo de vida no hospedeiro intermediário (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000) e podem persistir por toda vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998), cujo mecanismo ainda é desconhecido. Em algumas espécies, os hospedeiros intermediários, permanecem infectados por toda vida (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000), sendo assim, considerado o estágio crônico da doença (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos a parede do cistos é dissolvida por enzimas proteolíticas do estomago e intestino delgado. Os bradizoítos liberados penetram nas células epiteliais da parede do intestino delgado e iniciam inúmeras multiplicações assexuadas de gerações de *T. gondii* (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998).

Ao estágio final da fase de multiplicação assexual inicia-se a fase sexual do ciclo de vida do *T. gondii*, com a formação de oocistos que ocorrem nas células epiteliais do intestino delgado (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000), após a fertilização forma-se a parede em

torno do zigoto, e logo o epitélio infectado se rompe e libera o oocisto no lúmen intestinal (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998). Os oocistos não esporulados são sub-esféricos ou esféricos e possuem de 10 a 12 micrômetros de diâmetro (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998), e deixam o lúmen intestinal e vão para o meio ambiente através das fezes (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000) e necessitam sofrer esporulação para se tornarem infectantes (LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 2001), e esta ocorre nas fezes do gato entre 1 a 5 dias, dependendo da aeração, umidade e da temperatura ambiente (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998), quando esporulados os oocistos são sub-esféricos e apresentam de 11 a 13 micrômetros de diâmetro e no interior de cada oocisto existem dois esporocistos que medem de 6 a 8 micrômetros, e cada esporocisto contém quatro esporozoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998).

Os gatos albergam oocistos após a ingestão de qualquer um dos três estágios do *T. gondii*,; ou seja taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998).

O período pré-patente é de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos, maior ou igual a 18 dias após a ingestão de oocistos e 13 dias após a ingestão de taquizoítos. Menos de 38% dos gatos albergam oocistos após ingerirem taquizoítos ou oocistos, considerando que aproximadamente todos os gatos alojem oocistos após a ingestão de cistos teciduais (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998).

Ruiz; Frenkel, 1977, ao analisarem em fezes de gatos infectados experimentalmente pelo método de concentração (flutuação em solução de sucrose com alta densidade) detectaram pela microscopia a presença de oocistos em 12,7% das amostras, enquanto que pelo bioensaio em camundongos 87,3%.

Os gatos domésticos apresentam importante papel na epidemiologia da toxoplasmose (DUBEY, 1986), uma vez que contaminam águas, pastagens e solo, com oocistos eliminados pelas suas fezes (MAINAR *et al.* 1996; VAN DER PUIJE *et al.* 2000; PLANT; RICHARDSON; MOYLE, 1974; COUTINHO; LOBO; DUTRA, 1982), portanto, pode-se dizer que os oocistos eliminados resultam na contaminação ambiental (DUBEY, 2004).

As taxas de infecção em gatos, geralmente, são determinadas pelas taxas de infecção em populações de aves e roedores, que servem como fonte de alimento (DUBEY, 2004). Em inquérito epidemiológico, dados de soroprevalência em gatos são mais usuais que exames coproparasitológicos, pois a presença de anticorpos em gatos indica que provavelmente já tenham eliminado oocistos e, portanto, podem ser considerados como indicadores de contaminação ambiental (DUBEY; FRENKEL, 1972).

Pena *et al.*, 2005, analisaram o soro de 237 gatos do estado de São Paulo provenientes de 15 cidades, sendo que 35,4% dos gatos errantes foram reagentes para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo teste de aglutinação modificado (MAT – modified aagglutination test).

Os oocistos não esporulados podem sobreviver mais de 11 semanas em temperatura de geladeira; no meio ambiente, podem sobreviver por menos de 3 meses, com capacidade de se tornarem infectante (LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 2001). Os oocistos de *T. gondii* podem persistir no ambiente por um longo período (VILLENA *et al.*, 2004).

A sobrevivência de oocistos esporulados na água sob temperatura de -10°C até 70°C por diferentes períodos foi estudado por Dubey, 1998, e a infectividade foi comprovadas pelo bioensaio em camundongos, não havendo perda da infectividade quando estocada sob as temperaturas de 10°C, 15°C, 20°C e 25°C durante 200 dias, 30°C por 107 dias, 35°C por 32 dias, 40°C por 9 dias, 45°C por 1 dia, 50°C por 1 hora, 55°C e 60°C em 2 e 1 minutos respectivamente, já nas temperaturas de 4°C por 54 meses, enquanto que nas temperatura de -5°C por 106 dias e a -10°C durante 13 meses.

Os oocistos resistem por uma hora a tintura de iodo a 2%, etanol a 95%, amônia líquida, NaOH e ácido hipocloroso a 10% (AMATO NETO *et al.*, 1995).

Wainwrigth, *et al.*, 2007, utilizaram-se do hipoclorito de sódio (100mg/mL por 30 minutos, duas, quatro, oito, dezesseis e 24 horas) e do ozônio (6mg/L por um, dois, quatro, oito e doze minutos) na tentativa de inativar os oocistos presentes na água. A viabilidade dos oocistos foi testada pelo bioensaio em camundongos, porém, nenhum dos dois métodos foram capazes de inativar o oocisto de *T. gondii*.

A transmissão horizontal do *T. gondii* pode envolver três estágios do seu ciclo de vida: a ingestão de oocisto proveniente do meio ambiente, a ingestão de cistozoítos ou a ingestão de taquizoítos contidos em carnes ou vísceras de diferentes animais (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000)

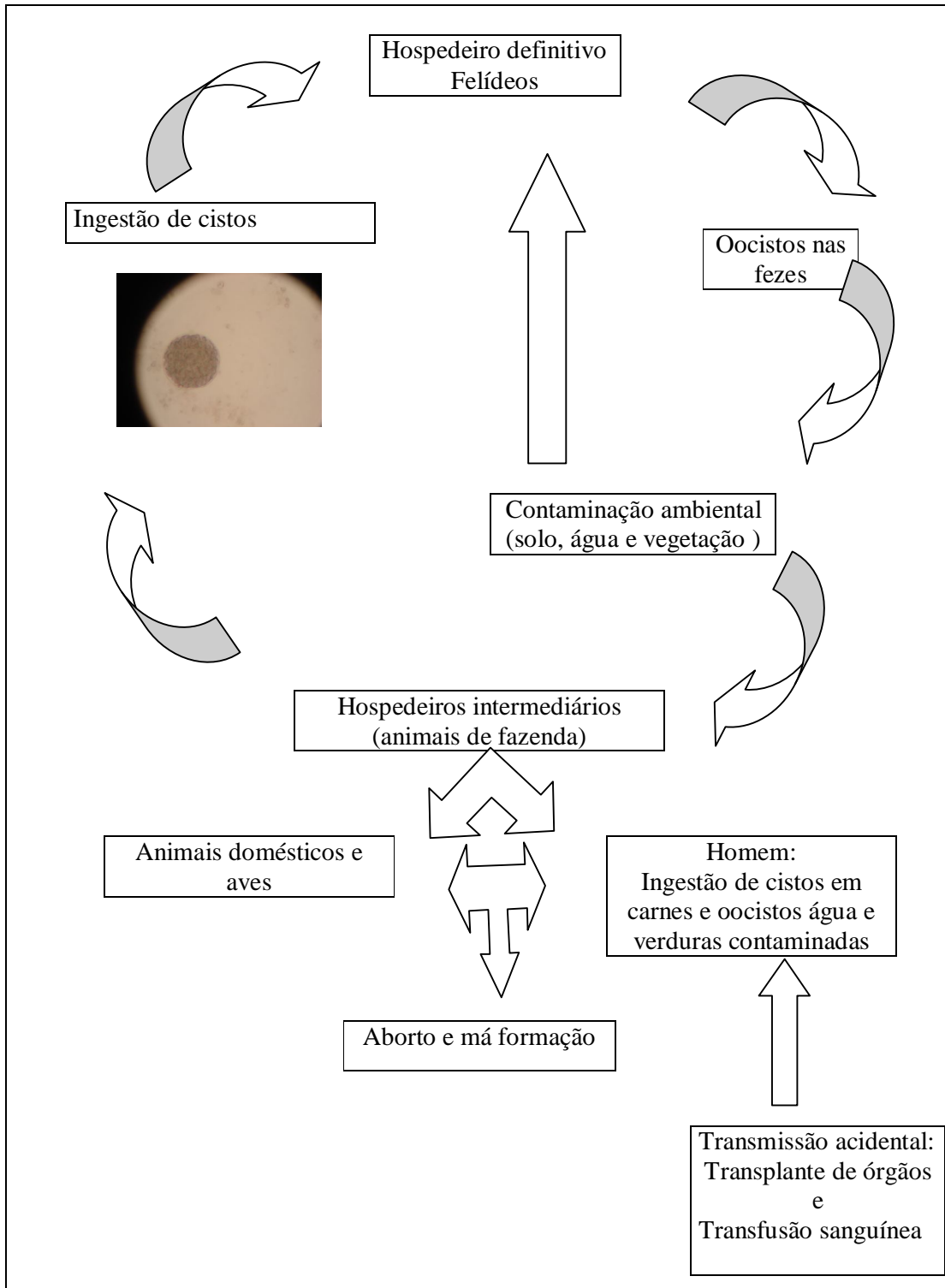


Figura 1- Ciclo do *Toxoplasma gondii*.

A infecção por *T. gondii* é caracterizada pelo desenvolvimento de resposta imune no hospedeiro, o que propicia a sua proteção evitando, assim, o rápido desenvolvimento de taquizoítos e conseqüentemente prevenindo a infecção severa (COSTA-SILVA; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2010).

Nos ovinos e bovinos, a toxoplasmose ocorre através da ingestão de oocistos presentes nos alimentos (pastos e ração) e solo contaminados (PLANT; RICHARDSON; MOYLE 1974; COUTINHO; LOBO; DUTRA 1982). Para Isaac-Renton *et al.* 1998, há a possibilidade de disseminação de oocistos não esporulados através de águas de superfície, contudo, considera-se a ingestão de oocistos como a principal via de transmissão para os herbívoros, particularmente, ovinos e caprinos (ENGELAND *et al.*, 1996; DUNCASON *et al.*, 2001).

Nos animais abatidos para o consumo humano a inspeção é prejudicada por ser a toxoplasmose uma infecção na qual, muitas vezes, os sinais clínicos e as lesões são inaparentes e dificultando o controle desta zoonose (SPÓSITO FILHA *et al.*, 1992).

Em algumas regiões brasileiras, o hábito de determinados grupos étnicos relativo ao manuseio e ao consumo de carne ou vísceras de ovinos cruas ou mal cozidas, são provavelmente os responsáveis pela ocorrência desta antropozoonose (LARSON *et al.*, 1980).

No Brasil, Bonametti *et al.* 1997, relataram surto de toxoplasmose aguda em humanos na cidade de Bandeirantes, no estado do Paraná; após ingestão de carne crua de carneiro (quibe). Após período de incubação de 6 a 13 dias, as pessoas apresentaram perfil sorológico compatível com toxoplasmose aguda com febre, cefaléia, mialgia, artralgia e adenomegalia (cervical ou cérico/axilar). Segundo Dubey, 2004, a infecção pelo *T gondii* em humanos pode se manifestar de forma localizada ou generalizada, sendo a linfadenite a forma mais freqüente. As linfadenopatias podem estar associadas à febre, mal-estar, fadiga e mialgias, dor de garganta e dor de cabeça.

Os casos de toxoplasmose humana na Europa foram associados por Dumètre *et al.*, 2006, à ingestão de carne crua de ovinos criados em sistema extensivo, embora dados sobre a doença em ovinos fossem relativamente escassos.

Nas Américas, recentes surtos de toxoplasmose em humanos podem estar relacionados à contaminação do meio ambiente (TENTER; HECKEROT; WEISS, 2000). A água constitui importante via de transmissão da toxoplasmose, pois é disseminadora de oocistos para a população humana e animais que a consomem. (DUBEY, 2004; DIAS; FREIRE, 2005; AUBERT; VILLENA, 2009; SROKA; WÓJCIK-FATLA; DUKIEWICZ, 2006).

O primeiro relato de contaminação no abastecimento municipal de água foi registrado em 1995 em Victoria, British Columbia, Canadá, e suscitou a hipótese de que a água do reservatório teria sido contaminada com fezes de gato (*Felis catus*) ou cougar (*Felis concolor*) contendo oocistos de *T. gondii* (ARAMINI, *et al.*, 1999).

O primeiro surto de toxoplasmose foi descrito no Panamá em 1979 com infecção de 39 soldados que beberam água de três nascentes contaminadas (BENSON *et al.*, 1982).

Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, no estado do Rio de Janeiro, relacionaram a presença de alta soroprevalência de toxoplasmose ao consumo de água não filtrada como potencial fonte de disseminação de oocistos de *T. gondii* entre a população de baixa renda daquela região.

Sroka; Wójcik-Fatla; Dutkiewicz, 2006, correlacionaram a alta incidência, 64,6%, de toxoplasmose entre os habitantes da região de Loblin (leste da Polónia) à presença de ocorrência de *T. gondii* em água de 87 propriedades das quais foram colhidas 114 amostras (80 de poço doméstico raso com carretilha manual, 16 de poço profundo com bomba e 18 com sistema de abastecimento). Dessas amostras de água de bebida a presença de DNA de *T. gondii* foi considerada positiva em 31 amostras (27,2%), sendo 30 de poço raso e 1 de águas de poço profundo, enquanto que todas as amostras de água do sistema de abastecimento foram negativas.

Para Sroka; Wójcik-Fatla; Dutkiewicz, *et al.*, 2006, a presença de oocistos e DNA de *Toxoplasma gondii* em água proveniente de poço é evidencia de contaminação ambiental, e formas dispersas do parasito podem criar risco de difusão da toxoplasmose entre homens e animais.

Fleck; Chessun; Perkins, 1972, foram os primeiros a isolar os parasitos de amostras de solo e de areia úmida de jardim, em uma propriedade em que três moradores possuíam anticorpos anti *T. gondii*. Ruiz; Frenkel; Cerdas, 1973, isolaram o parasito em quatro de quinze amostras colhidas em locais sombreados ou úmidos de solo de um quintal de uma residência e de uma plantação de café adjacente frequentados por gatos. Amendoeira; Lopes, 1980, recolheram amostras de solo úmido e sombreado de duas hortas frequentadas por gatos e encontraram oocistos em uma amostra e, após três passagens consecutivas em camundongos demonstraram a presença de organismos semelhantes a taquizoítos. Todas as amostras de solo foram colhidas de locais sombreados (não ocorrendo exposição à luz solar) e úmidos.

Azevedo, 1980, colheu 115 amostras de solo de dois bairros exclusivamente residenciais, arborizados e que ainda apresentavam terrenos baldios. As colheitas foram feitas com auxílio de colher a uma profundidade de aproximadamente 5 cm. A amostra de solo para inoculação em camundongos foi preparada utilizando solução de sacarose de densidade 1,15 e inoculado 0,5 mL em cada um de dois camundongos por via intraperitoneal. Como resultados duas amostras foram consideradas positivas pela técnica de Sabin e Feldman com títulos ≥ 16 .

Matsuo *et al.*, 2004, na tentativa de recolher maior quantidade de oocistos em amostras de solo contaminados experimentalmente modificaram a técnica de flutuação em sucrose ao adicionar ao 0,1% de gelatina na solução de lavagem e flutuação.

Lass, *et al.*, 2009, foram os primeiros a utilizar métodos moleculares e genotipagem de oocistos de *Toxoplasma gondii* presentes em amostras ambientais de solo.

Da SILVA *et al.*, 2003, com a finalidade de estudar as variáveis epidemiológicas na toxoplasmose ovina e caprina, colheram amostras de soro de propriedades localizadas em duas regiões do estado do Pernambuco: a região da Zona da Mata, próxima ao mar e com alto nível pluviométrico no inverno e clima ameno durante todo o ano, e a Zona do Agreste, transição entre o litoral e o interior do estado, com clima mais seco com menor índice pluviométrico. Dos soros de 173 ovinos e 213 caprinos analisados pela RIFI, determinaram que na zona da Mata 67,6% dos ovinos e 47,9% caprinos mostraram-se reagentes à RIFI, enquanto que na Região do Agreste 32,4% dos ovinos e 52,1% dos caprinos. Concluiu-se, portanto, que neste caso para alta prevalência da toxoplasmose, a umidade e o tipo de vegetação contribuíam para a formação de um microambiente favorável a manutenção de oocistos no solo.

A toxoplasmose é uma doença severa que afeta várias espécies e pode causar morte embrionária e reabsorção, morte fetal e mumificação, aborto, morte neonatal, principalmente, em ovelhas (FREYRE *et al.*, 1999) e em cabras (DUBEY, 2004)

Desde os anos 50, *T. gondii*, tem sido reconhecido como causa de abortos em ovelhas e bovinos Beverly; Watson⁷ (1959 *apud* UENO, 2005). O primeiro relato relacionado a abortos em ovinos foi descrito por Olafson e Monlux⁸ (1942 *apud* OGAWA *et al.*, 2003).

O *T. gondii* pode ser transmitido verticalmente por taquizoítos que são passados para o feto através da placenta (TENTER, HECKEROT, WEISS, 2000). Ao primeiro contato com o *T. gondii*, ovinos e caprinos em gestação podem estabelecer uma infecção placentária e fetal (BUXTON, 1998), enquanto que as ovelhas infectadas antes das prenhes não apresentam perdas reprodutivas (BEVERLEY; WATSON, 1971).

No estado do Oregon, EUA, a toxoplasmose foi diagnosticada como terceira causa infecciosa/parasitária de abortamento e mortalidade perinatal em ovinos (DUBEY; KIRKBRIDE, 1990).

⁷ BEVERLEY, J. K.; WATSON, W. A. Bovine abortion due to toxoplasmosis. **Nature**, 184, 2041, 1959

⁸ ONLAFSON, P.; MONLUX, W. S.; *Toxoplasma infection in animals*. **Cornell Veterinarian**, Itcha, v. 32, n. 2, p. 176-190, 1942.

A toxoplasmose ovina tem sido responsabilizada por perdas neonatais de 1 a 2% ao ano (BUXTON *et al.*, 2007). No Uruguai, estimou-se que 1,4 a 3,9%, de um total de 1.613 ovelhas, poderiam ter apresentado perdas reprodutivas associadas à toxoplasmose, representando prejuízo anual de US\$ 1,4 à 4.68 milhões para a ovinocultura Uruguiaia (FREYRE *et al.*, 1999).

A transmissão congênita entre ovelhas e cordeiros, frequentemente, constituem causa de aborto (TENTER, HECKEROT, WEISS, 2000, DUNCANSON *et al.*, 2001, FREYRE *et al.*, 1999) e morte durante o desenvolvimento fetal; o nascimento e o desenvolvimento dos cordeiros, raramente ocorrem (DUNCANSON *et al.*, 2001); há ainda a possibilidade de ocorrência de fetos mumificados (BUXTON, 1998).

Em 2006, Silva; De La Rue, analisaram a possibilidade de transmissão congênita do *T. gondii* a campo em duas propriedades no município de Rosário do Sul, RS, Brasil, ao avaliar as condições naturais de infecção e transmissão, sendo assim, descreveram resultados da detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (IgG e IgM) em amostras de soro de recém nascidos e de suas mães, sem sinais clínicos da infecção, com a finalidade de quantificação de anticorpos da classe IgG utilizando-se da RIFI e hemaglutinação indireta (HI) para anticorpos da classe IgM. Pelo método de hemaglutinação indireta 2-mercaptoetanol (HAI/2-ME), foram analisadas 87 fêmeas e 88 cordeiros. Das ovelhas testadas 39 (44,8%) foram sorologicamente reagentes à RFI e apenas 17 (19,5%) pela HAI, dentre as ovelhas reagentes apenas três apresentaram títulos para IgG e IgM. Em 22 cordeiros (18,3%) do total que apresentaram título na primeira colheita, houve decréscimo ou negatificação da resposta imunológica, indicando transferência passiva de anticorpos. Apenas quatro animais, 3,3% dos animais cujas mães indicavam infecção recente, apresentavam títulos crescentes de IgG da para a segunda colheita, sugerindo a possibilidade de transmissão congênita do *T. gondii*.

A infecção por *Toxoplasma gondii* pode ser diagnosticado indiretamente por métodos sorológicos ou diretamente por PCR, isolamento e histologia (MONTROYA, LIESENFELD, 2004)

Várias provas sorológicas têm sido propostas para a determinação de anticorpos anti-*T. gondii* desde que Sabin e Feldman realizaram o teste do corante (*Sabin-Feldman dye test*) em 1948 (DUBEY; BEATHIE, 1988).

A técnica indireta para o diagnóstico da toxoplasmose foi aperfeiçoada por Camargo, (1974), quando se introduziu pequenas modificações técnicas na reação de imunofluorescência indireta, como consequência os resultados obtidos foram comparáveis aos da reação de Sabin-Feldman, havendo uma concordância total quanto à positividade ou negatividade e os títulos de ambas as reações coincidiram ou divergiram em geral de apenas uma diluição no soro.

Os autores Fulton; Turk, 1959, descreveram o teste de aglutinação, porém não obtiveram êxito devido a baixa especificidade e a necessidade de uma grande quantidade de taquizoítos em cada exame.

O bioensaio em camundongos é a prova padrão para a detecção da infecção em tecidos (HOMAN *et al.*, 2000), devido a sua alta especificidade e sensibilidade (GARCIA *et al.*, 2006) entretanto, é trabalhosa, dispendiosa, demorada e, oferece riscos para o operador (ESTEBAN-REDONDO *et al.*, 1999).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é utilizada largamente para a detecção de *T. gondii* em fluido amniótico, sangue e tecido orgânico (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), assim como em amostras de água (ISAAC-RENTTON, *et al.*, 1998, VILLENA *et al.*, 2004, SROKA; WÓJCIK-FATLA; DUTKIEWICZ, 2006, KOURENTI, *et al.*, 2003) e solo (MATSUO *et al.*, 2004).

Para Kourenti, *et al.*, 2003, a presença de oocistos e DNA de *Toxoplasma gondii* em água proveniente de poço é evidencia de contaminação ambiental, e formas dispersas do parasito podem criar risco difusão da toxoplasmose entre homens e animais.

Os surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais não são frequentemente relatados, provavelmente, em função de sua sintomatologia inaparente (DIAS; FREIRE, 2005, COX, 2002). Entretanto, pode ser responsável por sérios casos de mortalidade e morbidade em recém-nascidos e indivíduos imunodeficientes (COX, 2002).

3. OBJETIVOS

De rebanhos de criação exclusiva de ovinos e de pastejo consorciado com bovinos provenientes da região de Sorocaba, São Paulo; objetivou-se:

1 – Determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos e bovinos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI);

2 – Detectar o DNA de *Toxoplasma gondii* pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em amostras de águas de superfície e de bebida e de solo.

3 – Detectar a presença de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas de superfície e de bebedouro e de solo pelo método de bioensaio em camundongos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção dos rebanhos

Foram estudados quatro rebanhos oriundos da região de Sorocaba, estado de São Paulo: dois com criação exclusiva de ovinos e dois com pastejo consorciado com bovinos. Os rebanhos, destinados a produção de carne, eram predominantemente formados por fêmeas e mantidos em sistema semi-extensivo com uso de pastejo suplementado com ração comercial e sal a cocho e faziam uso de água de bebida por meio do acesso a águas de superfície como rios, riachos e mananciais ou recebiam a água em bebedouro.

4.2. Identificação dos rebanhos

Tabela 1- Identificação dos rebanhos , seus respectivos sistemas de criação e número de animais, São Paulo, 2009.

Rebanhos	Condição	Localização	Número de Animais por Espécie	
A	O	Piedade, SP	37 ovinos	-
B	O	Piedade, SP	91 ovinos	-
C	C	Piedade, SP	37 ovinos	3 bovinos
D	C	Salto de Pirapora, SP	107 ovinos	14 bovinos
Total			272 ovinos	17 bovinos

O – criação exclusiva de ovinos; C – criação consorciado ovinos e bovinos.

4.3. Fatores de risco para presença de *Toxoplasma gondii* nos rebanhos

Para se determinar a presença de *Toxoplasma gondii* nas condições criatórias dos quatro rebanhos foram investigados dois fatores de risco: a convivência dos animais com gatos domésticos e o livre acesso às águas de superfície.

4.4. Colheita das amostras

As amostras clínicas e ambientais foram colhidas no período de fevereiro à março de 2008.

4.4.1. Amostras clínicas

Antes do fornecimento de ração, cerca de 10 mL de sangue dos animais foram colhidos de forma asséptica por meio de tubos a vácuo com gel. Após separação do coágulo, o soro sanguíneo foi transferido para frasco estéril e mantido a -20° C até o momento da utilização.

Um total de 272 amostras de soro sanguíneo de ovinos e 17 de bovinos, correspondentes a totalidade dos animais dos rebanhos foram analisadas.

4.4.2. Amostras ambientais

Um total de 13 amostras de águas de superfície provenientes de alagados, lagos, nascentes e minas: sendo duas do rebanho A, duas do rebanho B, duas do rebanho C e três do rebanho D; assim como quatro amostras de água dos bebedouros dos rebanhos A, B, C e D foram colhidas segundo método de Meirelles (2001) e acondicionadas em garrafas de 100 mL; identificadas de acordo com as propriedades e mantidas sob refrigeração a 4° C.

Foram também colhidas nove amostras de 40 gramas de solo cada, sendo duas do rebanho A, duas do rebanho B, duas do rebanho C e três do rebanho D, com auxílio de uma colher individualizada por amostra, segundo a técnica descrita por Azevedo (1981) sendo acondicionadas em frascos coletores universais estéreis. Para esta colheita foram selecionadas áreas úmidas e sombreadas dos locais onde os ovinos permaneciam a maior parte do tempo (pasto próximo ao aprisco, interior das baias e ao redor de lagos).

4.5. Exames laboratoriais das amostras clínicas

Os exames foram realizados no Laboratório de Raiva e Encefalites do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

4.5.1. Reação de imunofluorescência indireta-RIFI

Os soros dos ovinos e bovinos foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a determinação da presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, conforme Camargo (1974).

As amostras de soro sanguíneo dos ovinos e bovinos foram diluídas em solução salina tamponada -PBS, pH 7,4 na proporção de 1uL de soro para 64uL de PBS. Um total de 10 amostras de soros- teste por lâmina foram colocados sobre lâminas previamente sensibilizadas com taquizoítos de *T. gondii* Cepa Rh e em seguida incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e depois lavadas com solução PBS, pH 7.4 três vezes consecutivas com intervalos de 10 minutos. Após secarem em temperatura ambiente, foram coradas utilizando-se conjugado anti-IgG ovina marcada com isotiocianato de fluoresceína (affinity Purified Antibody Fluorescein – rabbit anti sheep IgG H + L, KPL, lote n. 040759) e diluído a 1:250 em solução de Azul de Evans à 0,001%, e conjugado anti-IgG bovina marcada com o isotiocianato de fluoresceína (affinity Purified Antibody Fluorescein – rabbit anti cattle IgG H + L, KPL, lote n. 040759, diluído a 1:300 em solução de Azul de Evans à 0,001% ; sendo novamente incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, o processo de lavagem com PBS foi repetido por mais três vezes consecutivas com intervalos de 10 minutos e finalmente secas em temperatura ambiente. A montagem da lâmina-lamínula foi feita utilizando-se glicerina tamponada pH 8. Em cada lâmina foram adicionados soro controle positivo e soro controle negativo de ovinos previamente analisados pela RIFI, cedidos pelo Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. Todas essas etapas foram realizadas sob proteção da luz. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência (NIKON – Eclipse) sob objetiva de 40X e ocular de 10X. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência periférica total e homogênea com títulos maior ou igual a 64 (FIGUIOULO *et al.*, 2004). Os soros com fluorescência incompleta, apical ou ausente foram considerados negativos. Os soros que apresentaram fluorescência no título de 64 foram submetidos a diluições seriadas de base 2 e realizada nova RIFI, seguindo-se o mesmo protocolo. O título final foi a maior diluição considerada positiva segundo os critérios de Camargo (1974), ou seja com fluorescência periférica total e homogênea dos taquizoítos.

4.6. Exames laboratoriais das amostras ambientais

4.6.1. Detecção de oocistos de amostras de águas de superfície e de bebedouros

Com a finalidade de concentrar a quantidade de *T. gondii* nas amostras de água, empregou-se 9 mL de solução sacarose (128g/100mL) com densidade inicial de 1,275 para cada 3 mL de água, resultando em densidade final de 1,150, que foram submetidas a centrifugação a 2.500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido com seringa estéril e reservado para o bioensaio em camundongos (AZEVEDO, 1981) e para PCR.

O limiar de detecção de DNA de *T. gondii* em amostras de água foi de $2,9 \times 10^2$ taquizoitos/mL.

4.6.2. Detecção de oocistos de amostras de solo

Cerca de um grama de solo colocado em tubo cônico foi adicionado à 10 mL de solução saturada de sacarose com densidade 1,27 e submetida a técnica de flutuação segundo RUIZ *et al.*; 1973. O produto resultante foi filtrado em gaze para outro tubo cônico com tampa, e submetido à centrifugação à 2.500 rpm por 10 minutos (AZEVEDO, 1981). O sobrenadante foi recolhido com seringa estéril e reservado para o bioensaio em camundongos e para PCR.

4.6.3. Reação em cadeia pela polimerase-PCR para detecção de DNA de *T. gondii* em amostras de água e solo

O DNA genômico foi extraído das amostras de sobrenadante de água e solo utilizando-se o Kit comercial DNAzol (Invitrogen®). Inicialmente as amostras de sobrenadante foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado por inversão e ressuspensão o sedimento em 100 µL de TE. Em seguida, foi adicionado 1 mL de DNAzol (Invitrogen®) e homogeneizado por inversão, centrifugado por 10.000 rpm durante 10 minutos. Ao retirar o material da centrifuga desprezou-se o sobrenadante por inversão e foram adicionados 500 µL de etanol puro, homogeneizada a amostra e centrifugada por 4.000 rpm durante 2 minutos, desprezado o sobrenadante por inversão e adicionado 850 µL de etanol 75%, centrifugado por 4.000 rpm durante 2 minutos. Novamente, desprezou-se o sobrenadante por inversão e foram acrescentados 850µL de etanol 75% e centrifugado. O

sobrenadante foi desprezado com o auxílio de uma pipeta, em seguida, ao sedimento foi adicionado 100 µL de NaOH a 8 mM e 40 µL de solução HEPES 0,1 M. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de execução da PCR.

A amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* foi realizada utilizando-se o método descrito por Homan *et al.*, 2000. Foram empregados os primers gênero específicos Tox4 e Tox5 (Tox 4: 5' CGC TGC AGG GAG GAA GAC GAA AGT TG 3' e Tox5: 5' CGC TGC AGA CAC AGT GCA TCT GGA TT 3') que amplificam fragmentos de 529 pb (HOMAN *et al.*, 2000). Para cada duas amostras clínicas foram utilizados 19,25µL de água ultra-pura para diluir 8,0 µL de DNTP, 5,0 µL de buffer, 3,0 µL do primer Tox 4, 3,0µL do primer Tox 5, 1,5 µL de MgCl₂⁺ e 0,25 µL da enzima taq polimerase, para um volume final de 20µL a ser distribuído em microtubos, em seguida acrescidos de 5 µL de cada amostra clínica a ser amplificada. A amplificação foi realizada em termociclador iniciando com incubação a 94°C por 7 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para a extensão final.

Para análise do produto amplificado foram homogeneizados 9µL das amostras amplificadas em 1µL de corante glicerinado (Blue juice – Invitrogen®) e em seguida foi realizada por eletroforese em gel de agarose à 1% (3g de agarose a ser diluído em 30ml de TBE 10X - 107g de tris base, 55g de ácido bórico, 7,44 g de EDTA (tristriplex) e acrescido de 270ml de água milliQ, 3,0 µL de Brometo de etídeo) em tampão de corrida TBE [1X] (100ml de TBE [10X] em 1000ml de água destilada q.s.p.) em voltagem constante de 136V por 30 minutos, e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta. (300-320nm) pelo sistema de fotodocumentação (Câmera Cannon) e analisado com o software D Image Analysis.

O limiar de detecção de DNA de *T. gondii* em amostras água foi de 2,9X10² taquizoitos/mL e no solo foi de 2,9X10⁶ taquizoitos/mL.

Para a análise dos produtos amplificados foram realizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M TRIS-Borato e 1 mM de EDTA pH 8,0) e o gel corado com brometo de etídeo foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/ cm.

4.7. Bioensaio em Camundongos

Após a realização da centrifugação descrita em 4.6.1 e 4.6.2 , ao sobrenadante de cada amostra (1 mL) foi acrescida gentamicina (2%) e imediatamente recolhido em seringas de insulina , o qual se constituiu no inóculo para o bioensaio em camundongos.

Para o isolamento do *T. gondii* a partir do sobrenadante de amostras de água e de solo foram empregados camundongos albinos, tipo suíço, adultos jovens, com peso aproximado entre 20 a 30 gramas, divididos em três grupos (teste, controle positivo e controle negativo).

Durante o bioensaio, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno no biotério do Laboratório de Raiva e Encefalites de Instituto Biológico de São Paulo com sistema 12 horas claro e 12 horas escuro e exaustão de ar. Os animais foram alimentados com ração industrial peletizada e água da rede de abastecimento.

Para cada amostra de inócuo (sobrenadante de água e de solo) foram utilizados cinco camundongos, sendo dois inoculados por via intraperitoneal e três por via oral.

No total foram utilizados 26 camundongos para o bioensaio com amostras do sobrenadante de água e 20 para o sobrenadante das amostras de solo. Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com 0,2 mL amostras de sobrenadante de água e de solo.

Para a inoculação por via oral foram utilizados 66 animais que ingeriram 0,2 ml de sobrenadante de amostras de água e de solo.

Durante os experimentos foi mantido um grupo controle positivo composto de cinco animais, que foram inoculados por via oral com amostra de cepa cistogênica de *T. gondii* cedida pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, e outro grupo controle negativo composto de três animais inoculados por via intraperitoneal e três animais inoculados por via oral com solução de sacarose (128g/100ml) densidade 1,275.

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CETEA-IB, identificado pelo protocolo nº 47/08 em 16 de abril de 2008, estando de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). (ANEXO I)

4.7.1. Colheita das amostras dos camundongos

4.7.1.1.Soro

As colheitas sorológicas foram realizadas aos 0 e 30 dias pós inoculação dos camundongos, por punção das veias laterais da cauda, após anestesia tópica de lidocaína 2%.

Aos 60 dias, o sangue foi colhido por punção cardíaca e para tanto os camundongos foram pesados em balança analítica e anestesiados com solução de cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de ketamina 10%, diluídos a 2mg/mL e 10mg/mL em solução salina (0,9%), respectivamente. O anestésico foi administrado em dose única de 0,1 mL para cada 10g de peso corporal, por via intraperitoneal (SESTERHEIM; SAITOVITCH, 2005). Após o procedimento de colheita do sangue os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂.

4.7.1.2. Órgãos

Após eutanásia, os camundongos foram submetidos à necropsia para retirada do fígado, pulmão, baço, coração e cérebro, os quais foram armazenados em tubos cônicos devidamente identificados e mantidos em freezer -20°C até o momento de execução da PCR.

4.7.2. Análises laboratoriais

4.7.2.1. Reação de imunofluorescência indireta dos soros dos camundongos

Os soros dos camundongos foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a determinação da presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, seguindo o método descrito por Camargo (1974).

Este procedimento foi realizado da mesma forma como descrito no item **4.4.1.** com os soros diluídos na proporção de 1:16, conforme descrito por Da Silva; Langoni (2001), Kourentii *et al.*, (2003), Costa-Silva e Pereira-Chiocola (2010). Para a coloração das lâminas utilizou-se o conjugado anti-IgG camundongo, marcado com isotiocianato de fluoresceína (anti-mouse IgG- whole molecule -FITC, produced in goat, affinity isolated antibody - SIGMA F0257) diluído a 1:250 em solução de Azul de Evans à 0,001. Os soros que apresentaram fluorescência no título 16 foram considerados reagentes e foram submetidos a nova RIFI em diluições seriadas de base 2, seguindo-se o mesmo protocolo. O título final foi a maior diluição considerada positiva; ou seja a presença de fluorescência periférica total e homogênea e morfologicamente compatível com *T. gondii*.

4.7.2.2. Reação em cadeia pela polimerase-PCR para detecção de DNA de *T. gondii* em órgãos dos camundongos

Para detecção de DNA de *T. gondii* em órgãos dos camundongos do bioensaio, foi realizada a reação em cadeia pela polimerase- PCR. Uma alíquota de 0,2g de cada órgão foi macerada com 0.8 mL de Tampão Eluição – TE (1,2g de Tris, 1 ml de EDTA 0,5M pH 8, 1L água milliQ, pH 7,4) e mantida a -20°C.

O DNA genômico foi extraído dos órgãos utilizando-se DNazol (Invitrogen®). Inicialmente a suspensão das amostras foi submetida à centrifugação 2.000 rotações por minuto (rpm), e 500 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, identificados,

centrifugados por 13.000 rpm durante 20 minutos, descartado o sobrenadante por inversão e ressuspenso o sedimento em 100 µL de TE. Em seguida, foi adicionado 1 mL de DNAzol (Invitrogen[®]) e homogeneizado por inversão, centrifugado por 10.000 rpm durante 10 minutos. Ao retirar o material da centrifuga desprezou-se o sobrenadante por inversão e foram adicionados 500 µL de etanol puro, homogeneizada a amostra e centrifugada por 4.000 rpm durante 2 minutos, desprezado o sobrenadante por inversão e adicionado 850 µL de etanol 75% , centrifugado por 4.000 rpm durante 2 minutos. Novamente, desprezou-se o sobrenadante por inversão e foram acrescentados 850µL de etanol 75% e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado com o auxílio de uma pipeta, em seguida, ao sedimento foi adicionado 100 µL de NaOH a 8 mM e 40 µL de solução HEPES 0,1 M. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de execução da PCR.

A amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* foi realizada utilizando-se o método descrito por Homan *et al.*, 2000. Foram empregados os primers gênero específicos Tox4 e Tox5 (Tox 4: 5' CGC TGC AGG GAG GAA GAC GAA AGT TG 3' e Tox5: 5' CGC TGC AGA CAC AGT GCA TCT GGA TT 3') que amplificam fragmentos de 529 pb (HOMAN *et al.*, 2000, GARCIA *et al.*, 2006). Para cada duas amostras clínicas foram utilizados 19,25µL de água ultra-pura para diluir 8,0 µL de DNTP, 5,0 µL de buffer, 3,0 µL do primer Tox 4, 3,0µL do primer Tox 5, 1,5 µL de MgCl₂⁺ e 0,25 µL da enzima taq polimerase, para um volume final de 20µL a ser distribuído em microtubos, em seguida acrescidos de 5 µL de cada amostra clínica a ser amplificada. A amplificação foi realizada em termociclador iniciando com incubação a 94°C por 7 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para a extensão final.

O estabelecimento do limiar de detecção da PCR foi realizado a partir da contaminação experimental de órgãos de camundongos sadios com cepa Rh de *Toxoplasma gondii*. A dose infectante foi determinada em câmara de Neubauer. A concentração da suspensão inicial foi de 2,9X10⁷ taquizoítos/mL e dessa suspensão foi retirado 0,1mL para contaminação experimental de 0,9 mL de pulmão, fígado e cérebro, macerados individualmente e submetidos a diluição seriada de base 10. De cada diluição de órgão contaminado foi realizada a extração do DNA com o reagente comercial DNAzol (INVITROGEN), utilizando-se os primers descritos por Homan *et. al.* (2000).

O limiar de detecção para fígado foi de 2,9X10⁶ taquizoítos/mL e 2,9X10³ taquizoítos/mL para pulmão e cérebro. Como controle positivo para toxoplasmose foi utilizada a cepa cistogênica de *Toxoplasma gondii*, e para controle negativo foi utilizada solução de diluição de amostras clínicas.

Para análise do produto amplificado foram homogeneizados 9µL das amostras amplificadas em 1µL de corante glicerinado (Blue juice – Invitrogen®) e em seguida foi

realizada por eletroforese em gel de agarose à 1% (3g de agarose a ser diluído em 30ml de TBE 10X - 107g de tris base, 55g de ácido bórico, 7,44 g de EDTA (tristriplex) e acrescido de 270ml de água milliQ, 3,0 µL de Brometo de etídeo) em tampão de corrida TBE [1X] (100ml de TBE [10X] em 1000ml de água destilada q.s.p.) em voltagem constante de 136V por 30 minutos, e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta. (300-320nm) pelo sistema de fotodocumentação (Câmera Cannon) e analisado com o software D Image Analysis.

4.8. Tratamento estatístico dos dados

Para o cálculo da frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Sorocaba, SP, foram contabilizados o número de animais soro-reagentes à RIFI sobre o número total de animais examinados.

Na comparação dos diferentes grupos de camundongos submetidos ao bioensaio com relação à proporção de positivos, foi utilizado o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (CALLEGARI-JACQUES, 2003), com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Todos os rebanhos apresentaram pelo menos um animal sorologicamente reagente para *Toxoplasma gondii* na RIFI, sejam os exclusivos de ovinos ou consorciados com bovinos.

Das 272 amostras de soros dos ovinos, 86/272 (31,62%) foram reagentes considerando-se como ponto de corte a diluição $\geq 1:64$ e 186/272 (68,38%) das amostras foram consideradas não reagentes. A frequência de ovinos reagentes por rebanho variou entre 21,98% (20/91 Rebanho B) a 75,67% (28/37 Rebanho A), com títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* entre 64 a 1.024 (Tabela 2 e Figura 2).

As 17 amostras de soro dos bovinos que foram analisadas pela reação de imunofluorescência indireta, mostraram (16/17) 94,12% reagentes, sendo que a frequência de bovinos reagentes por rebanho variou entre 92,86% (13/14 Rebanho D) e 100% (3/3 Rebanho C). O título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos variou entre 64 e 512 (Tabela 2 e Figura 3).

As treze amostras de águas de superfície e de bebedouro e as dez amostras de solo mostraram-se negativas na reação de PCR.

Todos os camundongos utilizados no bioensaio foram negativos à RIFI antes da inoculação de amostras de águas e de solo.

As amostras sorológicas dos camundongos do bioensaio foram reagentes aos 30 e 60 dias após a inoculação (dpi), com títulos variando de 16 a 256, conforme apresentado nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2 – Frequência de rebanhos e de animais reagentes para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* na reação de imunofluorescência indireta, em criações exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos, São Paulo, 2009.

Identificação da propriedade	Condição criatória	Reagentes		
		Rebanhos	Animais reagentes/ total examinado (%)	
			Ovinos	Bovinos
A	O		28/37 (75,67)	–
		2/2		
B	O		20/91 (21,98)	–
C	C		10/37 (27,03)	3/3 (100)
D	C	2/2	28/107 (26,17)	13/14 (92,86)
TOTAL		100%	86/272 (31,6)	16/17 (94,12)

O - Criação exclusiva de ovinos; C - Criação consorciada ovinos e bovinos.

Houve diferença na proporção de positivos na comparação entre os rebanhos das propriedades A X B, A X C e A X D, ou seja, a proporção de positivos na propriedade A é significativamente maior do que nas outras ($P < 0,001$). Com relação aos bovinos, não houve diferença ($P > 0,05$) na proporção de positivos.

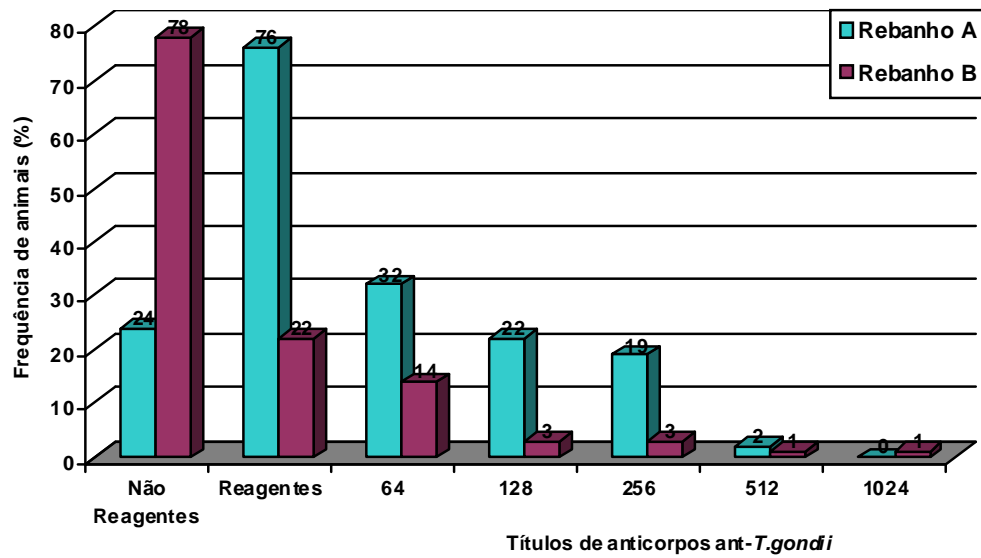


Figura 2 – Frequência de animais reagentes e distribuição dos títulos sorológicos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em dois rebanhos exclusivos de ovinos. São Paulo, 2009.

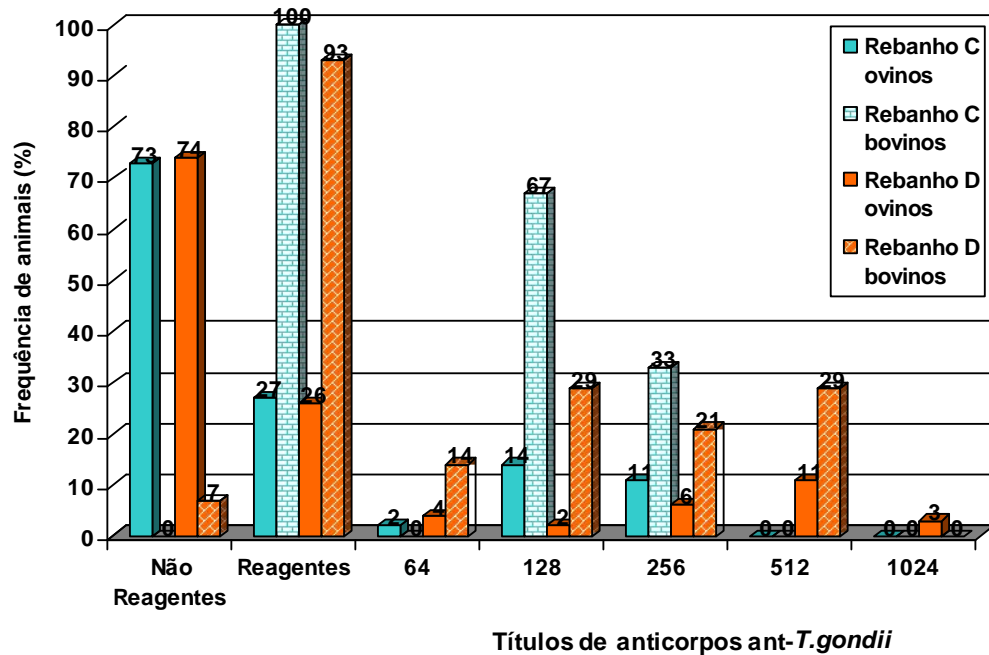


Figura 3 – Frequência de animais reagentes e distribuição dos títulos sorológicos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em dois rebanhos de ovinos consorciados com bovinos. São Paulo, 2009.

Tabela 3 – Título de anticorpos anti-*T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta de soro de camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e oral (VO) com amostras de águas de superfície colhidas nas propriedades com criações exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos, São Paulo, 2009.

Propriedade/ Local de colheita	n.º de camundongos positivos/ inoculados IP	IP Título		n.º de camundongos positivos/ inoculados VO	VO Título	
		30 dpi.	60 dpi.		30 dpi.	60 dpi.
A/ bebedouro	2/2	16,16	32, NR	1/3	16, NR, NR	NR, NR, NR
A/Lago	2/2	16, 128	32, 32	0/3	3NR	3NR
A/Poço	1/2	256, NR	16, NR	0/3	3NR	3NR
Total	5/6 (83,3 %)			1/9 (11,1%)		
B/Bebedouro	1/2	NR, 128	NR, 16	2/3	3 NR	NR,16, 16
B/Alagado	0/2	2NR	2NR	2/3	NR, 16, 16	3NR
B/Nascente	2/2	NR,16	16, 16	2/3	16, 16, NR	3NR
Total	3/6 (50,0%)			6/9 (66,6%)		
C/Bebedouro	1/2	NR, 64	NR, 16	1/3	16, 2NR	16, 2NR
C/ lago	2/2	16, 16	128, 32	2/3	16, 16, NR	16, 16, NR
C/Poço	1/2	16, NR	64, NR	0/3	3NR	3NR
Total	4/6 (66,6%)			3/9 (33,3%)		
D/Bebedouro	1/2	16, NR	64, 16	2/3	NR, 16, 32	2NR, 16
D/Lago1	0/2	2NR	2NR	1/3	16	2NR, 16
D/Lago 2	0/2	2N	2NR	2/3	2NR, 16	16, 2NR
D/Nascente	2/2	16, 16	16, 32	2/3	NR, 16,16	2NR,16
Total	3/8 (37,5%)			7/12 (58,3%)		

Dpi= dias pós inoculação

Pela análise da tabela 3, com relação às comparações das vias de inoculação de amostras de águas de superfície colhidas em cada propriedade, observou-se diferença significativa apenas na propriedade A ($P < 0,05$).

Tabela 4 – Título de anticorpos anti-*T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta de soro de camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e oral (VO) com amostras de solo colhidas nas propriedades com criações exclusivas de ovinos e consorciadas com bovinos, São Paulo, 2009.

Propriedade/ Local de colheita	n.º de camundongos positivos/ inoculados	IP Título		n.º de camundongos positivos/ inoculados	VO Título	
		30 dpi.	60 dpi.		30 dpi.	60 dpi.
A/Aprisco	2/2	64, 128	128, 32	2/3	NR, 16, 32	2NR, 16
A/interior das baias	2/2	256, 16	128, NR	2/3	NR, 32, 16	2NR, 16
A/solo com fezes de gato	1/2	64	128	1/3	16	16
Total	5/6 (83,3%)			5/9 (55,5%)		
B/aprisco	1/2	NR, 32	NR, 16	3/3	16, NR, NR	16, 16, 16
B/Interior das baias	1/2	32	16	0/3	NR	NR
Total	2/4 (50,0%)			3/6 (50,0%)		
C/aprisco	1/2	16	NR	2/3	16, 16	16, NR
C/Margem do lago	2/2	64, 16	64, NR	1/3	16	NR
Total	3/4 (75,0%)			3/6 (50,0%)		
D/Interior das baias	1/2	NR	16	2/3	16, 2NR	2NR, 16
D/Aprisco	2/2	16, 16	16, NR	3/3	16, 16, NR	NR, NR, 16
D/Margem do lago	1/2	NR	16	3/3	16, NR, NR	16, 16, 16
Total	4/6 (66,7%)			8/9 (88,0)		

Dpi= dias pós inoculação

Com relação às vias de inoculação IP e VO de amostras de solo (Tabela 4) na mesma propriedade não se observou diferença significativa.

Pela análise das tabelas 3 e 4 observa-se que as quatro propriedades apresentaram oocistos nas amostras de águas de superfície e de bebedouro e de solo.

A figura 4 apresenta amostra sorológica positiva onde se observa fluorescência periférica total e homogênea, e as figuras 5 e 6 mostram soros com fluorescência incompleta, apical ou ausente e considerados negativos

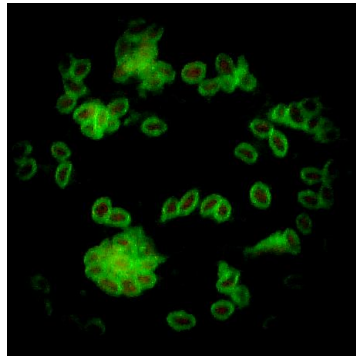


Figura 4 – Reação de imunofluorescência indireta -RIFI, Padrão Positivo (aumento 400X).

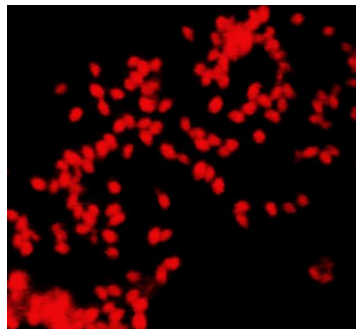


Figura 5 – Reação de imunofluorescência indireta -RIFI, Padrão Negativo (aumento 400X).

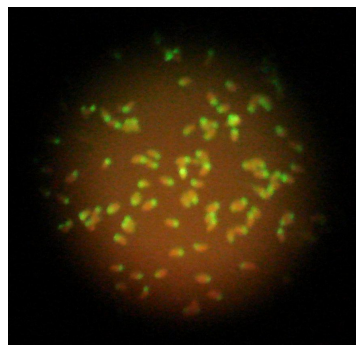


Figura 6 – Reação de imunofluorescência indireta -RIFI I, Padrão Apical Negativo (aumento 400X).

Tabela 5 – PCR dos órgãos dos camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e via oral (VO) com amostras de águas de superfície e de bebedouro, São Paulo, 2009.

Propriedade/ Local de colheita	n.º de camundongos positivos/ inoculados	IP			VO			
		pulmão	fígado	cérebro	pulmão	fígado	cérebro	
A/ bebedouro	2/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
A/ lago	2/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
A/ poço	1/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
B/ bebedouro	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
B/ alagado	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
B/ nascente	2/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
C/ bebedouro	1/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
C/ lago	2/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
C/ poço	1/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
D/ bebedouro	2/2	Positiva	Negativa	Negativa	1/3	Positiva	Negativa	Negativa
D/ lago 1	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
D/ lago 2	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
D/ nascente	2/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
Total	15/26 (57,7%)	15	0	0	1/39 (2,5%)	01	0	0

Pela tabela 5, observou-se diferença na proporção total entre as vias IP e VO ($P < 0,05$)

Tabela 6 – PCR dos órgãos dos camundongos do bioensaio inoculados por via intraperitoneal (IP) e via oral (VO) com amostras de solo, São Paulo, 2009.

Propriedade/ Local de colheita	n.º de camundongos positivos/ inoculados	IP			n.º de camundongos positivos/inoculados	VO		
		pulmão	fígado	cérebro		pulmão	fígado	cérebro
A/aprisco	1/2	Positiva	Negativa	Negativa	1/3	Positivo Negativa Negativa	Negativa Negativa Negativa	Negativa Negativa Negativa
A/interior das baías	1/2	Positiva	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
A/fezes do gato	2/2	Positiva Positiva	Negativa Negativa	Negativa Negativa	2/3	Negativa Positiva Positiva	Negativa Negativa Negativa	Negativa Negativa Negativa
B/aprisco	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
B/interior das baías	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
C/aprisco	1/2	Positiva	Negativa	Negativa	1/3	negativa	Positiva	Negativa
C/margem do lago	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
D/margem do lago	1/2	Positiva	Negativa	Negativa	1/3	Negativa	Negativa	Positiva
D/aprisco	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	0/3	Negativa	Negativa	Negativa
D/interior das baías	0/2	Negativa	Negativa	Negativa	2/3	Negativa Positiva Positiva	Negativa Negativa Negativa	Negativa Negativa Negativa
Total	6/20 (30%)	6	0	0	7/30 (23,3%)	5	1	1

Pela tabela 6, não houve diferença na proporção total entre as vias IP e VO ($p > 0,05$).

Pela análise das tabelas 5 e 6 verifica-se entre os órgãos de camundongos do bioensaio analisados pela PCR o pulmão foi o órgão de escolha na detecção de DNA de *T. gondii* independentemente da via de inoculação adotada (IP ou VO).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi estabelecida a freqüência de anticorpos sorológicos anti-*Toxoplasma gondii* dos animais de quatro propriedades da região de Sorocaba, estado de São Paulo, sendo duas de criação exclusiva de ovinos e duas cujo pastejo dos ovinos era consorciado com bovinos e sua relação com a presença de oocistos no ambiente.

Os trabalhos nos quais os autores analisam a freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos no Brasil são inúmeros; porém, são inexistentes os que analisam a freqüência da toxoplasmose em rebanhos de criação de ovinos, comparados a rebanhos de ovinos em pastejo consorciado com bovinos, e os correlacionaram à presença de oocistos de *T. gondii* em amostras de solo e água.

Do total de animais examinados, anticorpos sorológicos anti-*T.gondii* foram observados em 31,62% (86/272) dos ovinos e em 94,12% (16/17) dos bovinos, indicando exposição ao agente. Com relação à freqüência sorológica de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* dos ovinos pode-se inferir que os resultados encontrados neste estudo são concordantes com outros estudos realizados no estado de São Paulo por outros autores. Figliuolo, *et al.* (2004), identificaram 34,7% (207/597) de ovinos sororeagentes; Da Silva; Cutolo; Langoni (2002) ao testar pela RIFI para toxoplasmose 100 soros de ovinos aleatoriamente recebidos para diagnóstico de outra enfermidade, observaram 23 % de soropositividade.

A freqüência de ovinos reagentes ao *Toxoplasma gondii* nas quatro propriedades da região de Sorocaba, SP, demonstrou-se inferior quando comparada com ovinos de outras regiões do Brasil. No estado do Paraná, na microrregião de Londrina (cidades de Cambe, Rolândia, Iporã e Arapongas), Ogawa *et al.* (2003), relataram a freqüência de anticorpos anti-*T. gondii* em ovinos de 54,6% (185/339) utilizando-se da RIFI; Garcia *et al.* (1999), em estudo de 228 ovinos de 11 propriedades do município de Jaguapitã, determinaram a soroprevalência de 51,8% de um total de 228 ovinos e Romanelli *et al.* (2006) em Guarapuava estimaram a prevalência de ovinos positivos para anticorpos anti-*toxoplasma gondii* pela RIFI em 51,47% (157/305).

No Distrito Federal, utilizando-se da mesma técnica, UENO, (2005) obteve resultado semelhante, onde 35,41% (364/1028) das matrizes e reprodutores da espécie ovina eram sororeagentes ao *T.gondii*, a prevalência por propriedade foi de 100%, pois em todas as 32 propriedades possuía ao menos um animal positivo.

Da Silva, *et al.* (2003) pela RIFI analisaram amostras sorológicas de 173 ovinos provenientes de duas regiões do estado de Pernambuco (Zona da Mata e Agreste) e encontraram como positivos 35,3% dos animais.

Em Minas Gerais, Carneiro (2006), analisando pela RIFI amostras sorológicas de 711 ovinos provenientes da região Centro, Oeste e Sul do estado encontrou soroprevalência de 43,2% utilizando-se da RIFI e 31,2% pelo teste de ELISA. No estado do Rio Grande do Norte, Lajes, Clementino *et al.*, 2007, utilizando-se apenas o ELISA determinou soroprevalência semelhante de 29,41% em análise de 102 ovinos.

Com relação aos bovinos em pastejo consorciado com ovinos, foram constatados valores superiores aos relatados em outras regiões do país, observando-se 94,12% reagentes.

No estado do Paraná, Marana, *et al.* (1995) identificaram 48,51% bovinos leiteiros como reagentes à RIFI, enquanto que Garcia *et al.* (1999), estimaram a soropositividade em 25,8% entre os bovinos oriundos do município de Jaguapitã, resultados semelhantes foram encontrados por Daguer, *et al.*, 2004, ao estudarem a soroprevalência em bovinos de matadouros da microrregião de Pato Branco, encontraram pela RIFI 41,4% (144/348).

Santos, 2008, ao analisar soros da espécie bovina em 50 propriedades da Região Sudoeste do estado do Mato Grosso detectou através da RIFI 71% de reagentes (1.420/2.000).

Resultados inferiores de frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos também foram encontrados por Spagnol, *et al.*, 2009 ao estudarem 600 amostras de soro bovinos provenientes de matadouros sob a Inspeção Municipal dos municípios de Ilhéus e Itabuna e do matadouro frigorífico de Jequié sob Inspeção Federal no estado da Bahia, independente de raça idade sendo identificado apenas com sexo e cidade de procedência, determinaram como reagentes a RIFI 11,83% (71/600), sendo que no município de Ilhéus foi de 19,1% (37/192), em Itabuna 9,8% (21/214) e Jequié 6,7% (13/21), assim como Albuquerque *et al.*, 2005, ao analisarem o soro de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro ao quais determinaram 14,77% (87/598) de animais reagentes a RFI para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

Em estudos que apresentaram resultados para espécie ovina e bovina simultaneamente estão Meireles (2001) e Garcia *et al.* (1999). No estado de São Paulo Meireles (2001) ao estudar a prevalência da toxoplasmose em 200 ovinos do município de São Manuel e 200 bovinos do município de Taquarituba do estado de São Paulo determinou 11% e 31% de bovinos e ovinos reagentes pela técnica de ELISA. Para

Garcia et al, (1991) em propriedades rurais do Norte do Paraná, determinaram reagentes pela RIFI 51,8% (118/228) amostras de soro ovino e 25,8% (103/400) amostras de bovinos .

Uma vez que não foi realizada naquela região a análise sorológica de rebanhos bovinos não consorciados com ovinos, não há como se inferir a inter-relação entre as espécies. Entretanto, dois importantes fatores de risco investigados poderiam determinar a presença de *Toxoplasma gondii* nas condições criatórias dos quatro rebanhos: a convivência dos animais com gatos domésticos e o livre acesso às águas de superfície.

A proporção de ovinos reagentes na propriedade A foi significativamente maior do que nas outras ($P < 0,001$). O convívio do gato doméstico, hospedeiro definitivo do *T. gondii* com o rebanho ovino da propriedade A, na qual as fezes deixadas no solo de pastejo apresentaram-se positivas no bioensaio poderia predispor a contaminação do solo por oocistos e conseqüentemente disseminar a toxoplasmose entre os animais.

Uma vez que não havia histórico da procedência dos bovinos, apesar de estarem em pastejo consorciado com os ovinos, não há como se discutir a elevada sorologia encontrada nesta espécie em relação a possível transmissão intra- espécie ou inter -especies. Aparentemente, o único fator de risco que significativamente elevou a freqüência de resultados positivos foi o convívio dos ovinos com o gato da propriedade A, o qual enterrava suas fezes no local de pastejo desses animais; pois a propriedade B, também exclusiva de ovinos, não apresentou significância estatística (Tabela 2).

Embora a técnica de PCR venha sendo empregada com sucesso em vários procedimentos diagnósticos em função de sua elevada sensibilidade e especificidade, não foi possível detectar a presença de DNA de oocistos em águas de superfície e de bebedouro e das amostras de solo nas quatro propriedades investigadas. Limitações da técnica advindas de substâncias inibidoras, do processo de extração de DNA das amostras ambientais ou outros fatores poderiam explicar tais resultados. A sensibilidade da PCR pode ser afetada por manuseio inadequado, remessa, e condições de armazenamento das amostras (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

MATSUO et al, 2004, propuseram o tratamento do sedimento resultante centrifugação de amostras de solo contaminadas experimentalmente com oocistos de *T. gondii* em solução de flutuação sacarose acrescida de 0,1% de gelatina utilizando-se 1-polyvinylpyrrolidone (PVP) adicionado ao tampão TE, aquecimento e resfriamento (à 98°C por 10 minutos, seguido por 4°C por 10 minutos) das amostras, seguindo-se da adição de 100mM de NaCl e a adição de albumina de soro bovino (BSA) durante a amplificação, e

essas modificações propostas contribuíram para a remoção de inibidores da PCR nas amostras de solo e, conseqüentemente o aumento da sensibilidade da prova.

No presente trabalho não foi possível recorrer às mudanças na técnica de flutuação em sacarose e a utilização de procedimentos para a remoção de substâncias inibidoras de PCR, como as descritas por Matsuo *et al.*, 2004.

Entretanto, Villena *et al.*, 2004, descreveram estratégias para detecção de muitos parasitos na água, incluindo oocistos de *T. gondii*, por meio da amplificação pela reação em cadeia pela polimerase, a qual foi capaz de detectar amostras de DNA de *Toxoplasma*, sempre que o bioensaio em camundongos foi negativo, principalmente com relação a aplicação da flutuação em sacarose.

Sroka; Wójcik-Fatla; Dutkiewicz, 2006, na região de Loblin (leste da Polónia) examinaram 114 amostras água, das quais a presença de DNA de *T. gondii* foi determinada como positiva em 27,2% (31/114) das amostras (27,2%), sendo 30 de poço raso e 1 de poço profundo, enquanto que todas as amostras de água do sistema de abastecimento foram negativas, utilizando-se, o Kit comercial Genomic Mini, A&A Biotechnology, Gdynia, Poland, e para a amplificação da cadeia de DNA com o Kit PCR DNA-GDNSK II.

Apesar do bioensaio em camundongos detectar que as amostras das águas de superfície, de bebedouros e do solo das quatro propriedades apresentavam oocistos (Tabelas 3, 4, 5 e 6), não se observou equivalência entre a frequência de animais sororeagentes entre elas. Desta constatação, poderia se inferir que a viabilidade do oocisto no ambiente estaria comprometida, limitando a disseminação do agente entre os animais; o que de certa forma, enfatiza o importante papel disseminador do felino criado na propriedade A.

Com relação à capacidade das vias de inoculação IP ou VO de amostras de águas de superfície e de solo em produzir infecção nos camundongos do bioensaio, poderia se inferir pelo menos uma hipótese: a dose infectante de oocistos presente nas amostras de solo da propriedade A seria capaz de produzir infecção em camundongos do bioensaio independentemente da via de inoculação IP ou VO (Tabelas 4 e 6). Fato contrário, foi observado em relação às amostras de águas de superfície desta propriedade, onde apenas a via IP foi significativamente mais infectante que VO (Tabelas 3 e 5). A propriedade A, por suas condições ambientais e de topografia inclinada permitia que os ovinos tivessem acesso ao solo contaminado por fezes do gato; e ainda, a lixiviação do

solo pelas águas de chuva em direção ao lago onde os animais se abasteciam de água de bebida favoreceriam a disseminação da infecção naquela propriedade.

Embora os oocistos de *T. gondii* sejam isolados de amostras de solo ainda não existe um método fidedigno para uso em larga escala (DUBEY, 2004).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nas condições experimentais deste trabalho pode-se concluir que a toxoplasmose está presente nos quatro rebanhos exclusivos de criação de ovinos e consorciados com bovinos examinados da região de Sorocaba.

O consumo de águas e o pastejo dos animais em solos contaminados com oocistos de *Toxoplasma gondii* foram detectados como importantes fontes de infecção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R. R.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. Prevalência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros do vale do Paraíba Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n.14, v. 3, p. 125-128 2005.

AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. S. **Toxoplasmose**, 4. ed., 145p. São Paulo, Sarvier, 1995.

AMENDOEIRA, M. R. R.; LOPES, P. F. A. **Isolamento de *Toxoplasma* em solo de horta**. Trabalho apresentado no V Congresso Brasileiro de Parasitologia Fiocruz, RJ, 1980.

ARMANI, J. J., STEPHEN, C., DUBEY, J. P., ENGELSTOFF, C., SCHWANTJE, H.; RIBBLE, C. S., Potencial contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts, **Epidemiology and infection**, 122: 305-325, Cambridge University, 1999.

AUBERT, D.; VILLENA, I., Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strateg and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France, **Mem, inst. Oswaldo Cruz**, 104(2), 290-295, 2009.

AZEVEDO, D. S. **Isolamento de oocistos de *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCCEAUX, 1909) em amostras de solo de dois Bairros de Recife (PE)**. Tese de doutoramento apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981

BAHIA OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G., Highly endemic, waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, 2003. **disponível em:** <http://origin.cdc.gov/ncidod/eid/vol9no1/pdfs/02-0160.pdf>; **acesso em: 18/08/09**

BENSON, M. W.; TAKAFUJI, E. T.; LEMON, S. M., GRENUP, R. L., SULZER, A. J., Oocysts-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. **New England Journal of Medicine**, v. 307, p. 666-669, 1982

BEVERLEY, J. K.; WATSON, W. A. Prevention of experimental and of naturally occurring ovine abortion due to toxoplasmosis. **The Veterinary Record**, v. 88, n. 5, p. 124-128, 1971.

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

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; DA SILVA, E. M. K., BORTOLIERO, A. L., Surtos de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 21-25, jan-fev, 1997.

BUXTON, D., Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis*): in sheep and goats: recent advances, **Veterinary Research**, v. 29 (3-4), p. 289-310, 1998 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689743>, acessado em: 20/08/09

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S. E.; ROGGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v. 21; 149 (1-2), p. 25-8, 2007.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística Princípios e Aplicações, Artmed, Porto Alegre, 2003.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, São Paulo, v. 10,n.3, p. 143-169, 1974.

CARNEIRO, A. C. A. V., **Soroepidemiologia da toxoplasmose caprina e ovina no Estado de Minas Gerais**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006

CARVALHO, R.B. Potencialidades dos Mercados para os produtos derivados de caprinos e ovinos. Disponível em: <<http://www.caprtec.com.br/art040521.htm>>. Acesso em: 27 abr 2008.

CLEMENTINO, M. M.; SOUZA, M. F.; ANDRADE NETO, V. F. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. **Veterinary Parasitology**, (2007) doi: 10. 1016/j. vetpar. 2007.02.036.

COSTA-SILVA, T. A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*: avaliação do parasitismo sanguíneo e resposta humoral em camundongos isogênicos AS/n. **Scientia Médica**, v. 10, n.1, p. 88-92, 2010.

COX, F. E. G., History of human parasitology, **Clinical Microbiology Reviews**, p. 595- 612, oct., 2002, disponível em: www.cmr.asm.org; acessado em: 15/08/09

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

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

DA SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LONGANI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do estado de Pernambuco, Brasil, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, jan-fev, p. 115-119, 2003.

DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; DA COSTA, T.; VIRMOND, M. P.; HAMANN W.; AMENDOEIRA, M. R. R. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, Jul-Ago, 2004.

DIAS, R. A. F., FREIRE, R. L., Surtos de toxoplasmose em humanos e animais, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n.2, p. 239-248, 2005, disponível em: http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_26_2_19_13.pdf, acessado em 18/08/09

DUBEY, J. P., Toxoplasmosis, **Journal of American Veterinary Medical Association**, 1994. disponível em: <http://www.avma.org/reference/zoonosis/zntoxopl.asp>, acessado em: 22/08/08.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* oocyst Survival under defined temperatures, **The Journal of Parasitology**, v. 84, n.4, p. 862-865, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis, **Vet. Parasitology**, v. 126, Issues 1-2, p. 57-72, 2004, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>, acessado em 18/08/08.

DUBEY, J. P., BEATHIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 219, 1988.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K., Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, n.1, p. 155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. Enzoitic toxoplasmosis in sheep in North- central United-States. **Journal Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 673-676, 1989 (a).

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts, **Clinical Microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998

- DUBEY, J. P.; MILLER, S.; POWELL, E. C.; ANDERSON, W. R.; Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abortions. **Journal American Veterinary Medical Associations**, v. 11, n. 2, p. 155-158, 1986.
- DUMÈTRE, A.; AJZEMBERG, D.; ROZETTE, L.; MERCIER, A.; DARDEÉ, M. L. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis, **Veterinary Parasitology**. V. 20, n. 142(3-4), p. 376-379, 2006.
- DUNCANSON, P.; TERRY, R. S.; SMITH, J. E; HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock, **International Journal for Parasitology**, 31 (14): 1699-1703, 2001
- ENGELAND, I. V.; WALDELAND, H.; KINDAHL, H.; ROPSTAD, E.; ANDRESEN, O. Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal-placental function in the goat. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p.61-74, 1996.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, l. 3, p. 155-171, 1999.
- FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOSO, A. M. A.; de PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. M.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brasil, **Small Ruminant Research** v.123, n. 3-4, p. 161-166, 2004.
- FLECK, D. G.; CHESSUN, B. S.; PERKINS, M. Coccidian like nature of *Toxoplasma gondii*. **British Medical Journal**, p. 111-112, 1972.
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCON, J.; CASTELLS, D.;CORREA, O.; CASSARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**. v. 73, n.1-2, p.13-15, 1999.
- FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats fecal stages identified as coccidian oocysts, **Science**, v. 167, p.893-896, 1970.
- FULTON, J. D.; TURK, J. K. Direct Agglutination test for *Toxoplasma gondii*. **Lancet**, v. 2, p. 1068, 1959.
- GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs, **Experimental Parasitology**, 113, 267-271, 2006.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; DE OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos de propriedades rurais do Norte do Paraná-Brasil., **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n.1, p. 91-97, 1999.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n.10, p. 634-640, 2002.

HILL, D.; SREEKUMAR, C.; JONES, J.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* **Infectious Disease: Foodborne Diseases**, v. 53, p 337-354, 1994

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VRESCHUEREN H. Identification of 200 to 300 fold repetitive 529 bp DNA fragment: and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International journal of Parasitology**, 30, 69-75, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE). Censo Agropecuário 2006: (a) **Confronto dos resultados dos dados estruturais dos Censos Agropecuários - Brasil - 1970/2006**, (b) **Confronto dos resultados dos dados estruturais dos Censos Agropecuários – Regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste, Sul e Região Sudeste - 1970/2006**, (c) **Confronto dos resultados dos dados estruturais dos Censos Agropecuários São Paulo - 1970/2006**, (d) **Resultados do Censo Agropecuário 1995-1996 e primeiros resultados do Censo Agropecuário 2006, segundo variáveis pesquisadas – São Paulo**. disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>, Acesso em: 29 Jul. 2009.

ISAAC-RENTON, J.; BOWIE, W. R.; KING, A.; IRWIN, G. S.; ONG, C. S.; FUNG, C. P.; SHOKEIR, O.; DUBEY, J. P., Detection of *Toxoplasma gondii* Oocysts in drinking Water, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.6, p. 2278-2280, 1998

JARDIM, S.S. **Anti-helmínticos no controle de nematódeos de ovinos**. Revisão Bibliográfica. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996, p. 45.1996.

KOURENTI, C.; HECKEROTH, A.; TENTER, A.; KARANIS, P. Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* em water, **Applied and environmental Microbiology**. V. 69, n. 1, p. 102-106, Jan. 2003.

LARSSON, C. E.; JAMRA, L. M.; GUIMARÃES, E. C.; PATTOLI, D. B. G.; DA SILVA, H. L. L. Prevalência de toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, vol 14, n. 4, p. 582-588, 1980.

LASS, A.; PIETKIEWICZ, H.; MODZELEWSKA, E.; DUMÈTRE, A.; SZOSTAKOWSKA, B.; MYJAK, P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods, **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**. v. 28, p. 599-605, 2009.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, L.; DUBEY, J. P, Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator condiction, **Veterinary Parasitology**. v.103, n. 4, p. 309-313, 2001.

MALIK, M.A.; DRESSEN, D.W.; DE LA CRUZ, A. Toxoplasmosis in sheep in Northeastern United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 263-274, 1990.

MANAIR, R. C.; DE LA CRUZ, C.; ASENSIO, A.; DOMINGUEZ, L.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. **Veterinary Research Communications**, v. 20, n. 2, p. 153-159, 1996.

MARANA, E. R. M.; VENTURINI, A. C. H.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do Norte do Paraná – Brasil, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 16, n.1, p. 40-42, 1995.

MATSUO, J.; KIMURA, D.; RAI, S. K.; UGA, S. Detection of *Toxoplasma oocysts* from soil by modified sucrose and PCR methods, **Southeast Asian Journal T Southeast Asian Journal Tropical Med. Public Helth**, v. 35, n. 2, p. 270-274, Jun. 2004.

MEDEIROS, J. X.; SANTO, E. E.; RIBEIRO, J. B. L. Cenário mercadológico da ovinocultura. In: **Simpósio Mineiro De Ovinocultura**, 4., 2005, Lavras. Lavras, 2005. p. 2-5.

MEIRELES, L. R., **Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo**. 171f. [dissertação] apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciência Biomédica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências, São Paulo, 2001

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

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T.C. Diagnóstico sócio-econômico da caprinocultura no sudoeste paulista. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.35, n.8, p.67-70, 2005. Disponível em: <<http://www.caprtec.com.br/artigos.htm>>. Acesso em 19/06/2009.

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

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

ROMANELLI, P. R.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V. S. O.; GARCIA J. L.; NAVARRO, J. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202-207, 2007.

RUIZ, A.; FRENKEL, J., Isolation of *Toxoplasma* from cat feces deposited in false attics of homes in Costa Rica, **Journal of Parasitology**, 63, 931-932, 1977.

RUIZ, A.; FRENKEL, J.; CERDAS, L., Isolation of *Toxoplasmas* from soil, **Journal of Parasitology**, vol 59, n. 1, p. 205-206, fev, 1973.

SANTOS, T. R. **Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos, cães e humanos da Região Sudoeste do Estado do Mato Grosso**, dissertação apresentada para a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Patologia Animal, Unesp, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2008, disponível em:

<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pan/m/3226.pdf>, acesso: 10/08/2010

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Instituto de Economia Agrícola (SAA/CATI/IEA). **Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008** <http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa> . acesso em: 20/06/08.

SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Transplante experimental cardíaco heterotópico e cutâneo em camundongos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**; 20(2): 174-181, 2005.

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

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; OLIVEIRA, L. L. S.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G.; ALBUQUERQUE, G. R. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em matadouros do estado da Bahia, Brasil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 42-45, abr.-jun. 2009

SPÓSITO FILHA, E., DO AMARAL, V. MACRUZ, R.; REBOUÇAS, M. M.; SANTOS, S. M.; DRUMOND, L. S. *Toxoplasma gondii* em ovinos: isolamento do parasita a partir de diafragmas de animais procedentes do Rio Grande do Sul e abatidos em mataedouros de São Paulo para consumo humano. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.1, n.2, p.117-119, 1992.

SROKA, J.; WÓJCIK-FATLA, A.; DUTKIEWICZ, J.; Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms, **Annals Agricultural Environmental Medicine**, v.13, p. 169-175, 2006.

TENTER, A. M.; HECKROTH A. R.; WEISS, L. M., *Toxoplasma gondii*: from animals to humans **International Journal of Parasitology**, v. 30, p.1217-1258, 2000.

UENO, T. E. H. **Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil.** Dissertação f. 107. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, 2005.

VAN DER PUIJE, W. N.; BOSOMPEM, K. M.; CANACOO, E. A.; WASTLING, J. M.; AKANMORI, B. D., The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats, Memorial Institute, **Acta Tropica**. v 76, n. 1, p. 21-26, 2000.

VILENA, I.; AUBERT, D.; GOMIS, P.; FERTÉ, H.; INGLARD, J. C.; DENIS-BISIAUX, H.; DONDON, J. M.; PISANO, E.; ORTIS, N.; PINON, J. M., Evaluation of strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water, **Applied and environmental microbiology**, v 70, n.7, p. 4035-4049, july 2004.

WALNWRIGTH, K. E.; MILLER, M. A.; BARR, B. C.; GARDNER, I. A.; MELLI, A. C.; ESSERT, T.; PACKHAM, A. E.; TRUONG, T.; LAGUNAS-SOLAR, M.; CONRAD, P. A. Chemical Inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 925-931, August, 2007.

7. Anexo I – CETEA



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 47/08, sobre o Projeto de Pesquisa: *Freqüência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii (Nicolle e Manceaux, 1909) em ovinos criados no Estado de São Paulo e isolamento de oocistos a partir de amostras de água e solo através de bioensaio em camundongos e PCR*, sob a responsabilidade da Dra. Maria do Carmo C. S. H. Lara está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 16 de abril de 2008.

São Paulo, 16 de abril de 2008.


Dra. Vera Cecília Annes Ferreira
Coordenadora da CETEA-IB



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ

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](#)