DANIELA PONTES CHIEBAO

**Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos: avaliação da
transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes
linhagens brasileiras**

São Paulo
2015

DANIELA PONTES CHIEBAO

Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos: avaliação da transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes linhagens brasileiras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3136
FMVZ

Chiebao, Daniela Pontes

Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos: avaliação da transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes linhagens brasileiras / Daniela Pontes Chiebao. -- 2015.

91 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Toxoplasmose. 2. Genótipos. 3. Resposta imune. 4. Patologia clínica. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos: avaliação da transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes linhagens brasileiras", protocolado sob o nº 2351/2011, utilizando 90 (noventa) camundongos, 22 (vinte e duas) ovelhas e 6 (seis) gatos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/11/2011.

We certify that the Research "Study of oral infection by *Toxoplasma gondii* in sheep: evaluation of experimental congenital transmission using different Brazilian strains", protocol number 2351/2011, utilizing 90 (ninety) mice, 22 (twenty-two) sheep and 6 (six) cats, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/23/2011.

São Paulo, 27 de julho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CHIEBAO, Daniela Pontes

Título: Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos: avaliação da transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes linhagens brasileiras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Às minhas sobrinhas, Estela e Elisa, direção onde aponta minha bússola.
A elas dedico este trabalho, esperando lhes deixar um mundo melhor.

Agradecimentos

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, principal colaboradora deste trabalho, pelos ensinamentos, orientação, apoio e amizade.

À MSc. Mayra Rocca, pela presença em todos os momentos.

Aos funcionários do VPS – Pirassununga, Antônio Santa Roza, José Roberto Devitti e João Metzner, pelo auxílio imprescindível durante a fase experimental.

Aos colegas da Pós-graduação, Aline Cabral, Estela Gallucci, Eduardo Marques, Juliana Martins Aguiar, Herbert Soares, Solange Oliveira, Marcos Gomes Lopes, Monize Gerardi, Julianne Naves, Vanessa Figueredo, Samantha Valadas e Sibebe Souza, que contribuíram de várias formas durante os anos do doutorado.

Aos funcionários do VPS - São Paulo, Pedro, Marcos, Renato e Washington, pela ajuda constante na rotina laboratorial.

Ao secretário da PG – VPS, Danival Lopes, pela competência, eficiência e disponibilidade.

À MV MSc. Danielle Passarelli, da FZEA-USP, por todo auxílio na realização das análises clínicas e discussão dos resultados.

Aos pós-graduandos do VRA da FMVZ-USP, Thiago Santin e Leonardo Batissaco, pela colaboração na fase de reprodução das ovelhas do experimento.

Ao prof. Dr. Ricardo Strefezzi e à doutoranda Lidia Hildebrand Pulz, do LOCT da FZEA-USP, pela realização das análises histopatológicas e da imunohistoquímica.

À Dra. Anaiá da Paixão Seva e à doutoranda Camila Marinelli Martins pelo desenvolvimento e realização dos testes estatísticos.

To the Proto Team of Moredun Research Institute for all the valuable experience and for substantially increasing my knowledge in science overall during my sandwich PhD at Edinburgh, Scotland.

Aos funcionários da biblioteca e do serviço de pós-graduação da FMVZ – USP, pela orientação nas fases finais do trabalho.

Aos colegas da UPD Sorocaba/APTA/SAA, Fábio, Junia, Eduardo, Margarida e Celina pelo apoio durante meu afastamento para realização do doutorado.

À Fapesp pelo financiamento do projeto de pesquisa e à CAPES pelo financiamento do PDSE.

Às pessoas que adotaram os gatos ao final do experimento.

RESUMO

CHIEBAO D. P. **Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos:** avaliação da transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes linhagens brasileiras. [Study of oral infection with *Toxoplasma gondii* in sheep: evaluation of congenital transmission in experimental infections using Brazilian atypical strains]. 2015. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Toxoplasma gondii é apontado como causa primária de doença congênita, abortamentos e natimortalidade em humanos e animais de produção. No Brasil, genótipos atípicos do parasita podem estar relacionados com ocorrência de enfermidade severa, inclusive em indivíduos imunocompetentes. Este estudo aplicou-se à reprodução experimental de infecções por *T. gondii* em ovinos, com vistas a estudar aspectos relacionados à ocorrência da transmissão congênita, avaliando reinfecções produzidas por diferentes genótipos de *T. gondii* isolados no Brasil. Treze ovelhas soronegativas para a infecção por *T. gondii* foram primo-infectadas com 2×10^3 oocistos esporulados via oral deste parasito, Grupo 1 (4 animais) com genótipo BrI e Grupos 2 e 3 (5 e 4 animais, respectivamente) com genótipo BrIII. Após a cronificação da infecção, os animais foram emprenhados. Da mesma forma, uma segunda infecção foi realizada após 2 meses de gestação, animais dos Grupos 1 e 3 receberam oocistos de *T. gondii* genótipo BrIII e o Grupo 2 recebeu BrI. Semanalmente foram observados os efeitos da reinfecção comparando com um grupo controle (5 animais) não infectado, através de exames físicos, ultrassonográficos, sorológicos, hematológicos e bioquímicos. Utilizando bioensaio em camundongos, análise molecular, exames histopatológicos e imunohistoquímica, avaliou-se a infecção experimental de ovelhas e cordeiros. Verificaram-se as diferenças entre as médias dos resultados dos grupos com ANOVA dois fatores para a sorologia e ANOVA um fator, post-hoc Bonferroni ou Kruskal-Wallis, post-hoc U de Mann-Whitney para os outros parâmetros, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$. Não foram observados abortamentos, obtiveram-se 19 cordeiros dos grupos experimentais, todos soronegativos. As ovelhas infectadas apresentaram altos títulos de IgG e hipertermia após a primo-infecção e aumento moderado após a reinfecção, com diferença estatística somente no Grupo 1. Parâmetros clínicos alterados nos grupos experimentais foram observados principalmente nos dias 21 e 28 após o desafio. Houve significância estatística comparando-se resultados de patologia clínica em infecções por genótipos diferentes em vários pontos de tempo. À necropsia, observou-se

fibrina nas placentas das ovelhas infectadas, um feto mumificado em uma das ovelhas do Grupo 2 e cordeiros e ovelhas com linfadenomegalia. PCR realizado em amostras de tecido alterado confirmou presença de *T. gondii* em linfonodos e coração de cordeiros do grupo 2 e coração e placenta de ovelhas do Grupo 3. Nos bioensaios em camundongos dos tecidos de cordeiros foram observados cistos cerebrais em um animal do Grupo 2, confirmados por PCR. Análises histopatológicas confirmaram taxa de transmissão de 26% nos três grupos experimentais. Exceto por uma ovelha do Grupo 1, todos os ovinos, incluindo o cordeiro positivo, estavam infectados com o isolado utilizado na primo-infecção. Observou-se maior frequência de transmissão congênita endógena em ovelhas soropositivas após reinfecção com genótipos diferentes, com alterações fisiológicas significativas em ovelhas gestantes, porém não acarretando abortamento ou malformações. A primo-infecção proporcionou imunidade cruzada contra reinfecção subsequente na maioria dos animais, aparentando maior eficácia quando utilizado genótipo BrIII.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Genótipos. Resposta imune. Patologia clínica.

ABSTRACT

CHIEBAO D. P. **Study of oral infection with *Toxoplasma gondii* in sheep: evaluation of congenital transmission in experimental infections using Brazilian atypical strains.** [Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos: avaliação da transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes linhagens brasileiras]. 2015. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Toxoplasma gondii is considered the primary cause of congenital disease, miscarriage and stillbirth in humans and farm animals. In Brazil, non-classical genotypes may be related with severe toxoplasmosis also in immunocompetent patients. This study evaluated infections and reinfections caused by two atypical field strains of *T. gondii* isolated in Brazil and their consequences over congenital transmission in sheep. Thirteen Santa Ines ewes seronegative for *T. gondii* were prime-infected orally with 2×10^3 sporulated oocysts, being Group 1 from genotype BrI (4 animals), whilst Groups 2 and 3 ewes received an inoculum from genotype BrIII (5 and 4 animals, respectively). After infection chronification all animals were mated. Likewise, a second inoculation was held at 2 months pregnancy, Group 1 and 3 receiving oocysts from genotype BrIII, while Group 2 was infected with genotype BrI. Blood samples for serology, CBC, biochemistry, vital signs evaluation and abdominal ultrasound were performed weekly, comparing with a control group (5 animals). Experimental infection from ewes and lambs was evaluated thru mice bioassay, molecular analysis, histopathological and immunohistochemical tests. To analyze serology variation between groups their mean results were subjected to two-way ANOVA. The other parameters were tested using one-way ANOVA followed by Bonferroni or Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney U, where statistical significance was set at $p < 0,05$. No abortion was observed and 19 lambs were born from ewes of the experimental groups presenting negative serology. Infected ewes showed high IgG titles and fever after prime-infection and moderate increase after reinfection, although only Group 1 presented statistical significance. Altered clinical values were observed from experimental groups mainly 21 and 28 days post challenge. Significant differences were detected when comparing infections from different genotypes. Post-mortem analysis revealed fibrin over placentas from ewes of all experimental groups; a mummified fetus inside an ewe from Group 2 and lymph nodes enlargement within ewes and lambs. PCR performed on altered tissues from necropsy confirmed presence of *T. gondii* on lymph nodes and heart of a Group 2 lamb and on placenta and heart of Group 3 ewes.

Considering mice bioassays from lamb tissues, one animal from group 2 presented brain smear cysts, also PCR analysis positive. Histopathological tests corroborate a congenital transmission rate of 26% among experimental groups. Apart from one ewe from Group 1 all the other animals, including the positive lamb, were infected with the strain from the prime-infection. Therefore, it was more frequently observed endogenous congenital transmission in seropositive ewes after reinfections with different strains leading to significant physiological variations in pregnant ewes, abortion and congenital malformations absence notwithstanding. The prime-infection also provided cross protective immunity against a following reinfection for the majority of the animals, suggesting apparent better response when performed using genotype BrIII.

Key words: Toxoplasmosis. Genotypes. Immune response. Clinical findings.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>TOXOPLASMA GONDII</i>	14
2.2	TOXOPLASMOSE EM OVINOS.....	17
2.3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	OBTENÇÃO DE INÓCULO DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	24
3.1.1	Reativação de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i>	24
3.1.2	Bioensaio em gatos.....	26
3.1.3	Teste de Viabilidade de Oocistos.....	28
3.2	INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVELHAS.....	29
3.2.1	Primeira infecção com <i>T. gondii</i>	29
3.2.2	Reprodução.....	31
3.2.3	Segunda infecção com <i>T. gondii</i>	31
3.3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVINOS.....	33
3.3.1	Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>	33
3.3.2	Parâmetros clínicos.....	33
3.3.3	Observações necroscópicas.....	34
3.3.4	Exames histopatológicos.....	35
3.3.5	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos.....	36
3.3.6	Identificação molecular de <i>Toxoplasma gondii</i>	38
3.3.7	Análise Estatística.....	39
4	RESULTADOS	41
4.1	BIOENSAIO EM GATOS.....	41
4.2	TESTE DE VIABILIDADE DE OOCISTOS.....	41
4.3	INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVINOS.....	43
4.3.1	Primeira infecção.....	43
4.3.2	Segunda infecção (desafio).....	45
4.4	ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS EM NECROPSIAS.....	52
4.4.1	Grupo 1.....	52
4.4.2	Grupo 2.....	54
4.4.3	Grupo 3.....	55
4.4.4	Grupo 4.....	56
4.4.5	Estatística.....	57
4.5	ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS EM NECROPSIAS.....	57
4.5.1	Histopatologia e imunohistoquímica.....	57
4.6	ISOLAMENTO EM CAMUNDONGOS.....	58
4.7	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	61
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Censo Agropecuário 2006 (IBGE, 2008), o Estado de São Paulo conta com 490.029 cabeças de ovinos em seu território sendo que esse efetivo se encontra dividido em 11.379 estabelecimentos agropecuários. Esses números mostram que o Estado detém o maior rebanho da região Sudeste. Nos últimos anos, a ovinocultura tem apresentado um considerável aumento, não apenas no número de cabeças como também de criadores interessados em investir no setor (NOGUEIRA et al., 2011).

O grande potencial de expansão da atividade no Brasil, principalmente na região Sudeste que compreende o maior mercado consumidor do país, fundamenta-se na crescente aceitação da carne de cordeiro, cuja produção não tem sido suficiente para atender à demanda do mercado interno e ainda se baseia no mercado informal, o que resulta no aumento da importação de ovinos vivos, carcaças e carne congelada ou refrigerada (SIQUEIRA, 1996; FIRETTI et al., 2014).

Estudos que contribuam para o aumento da produtividade nessas criações com aplicação prática imediata vêm ao encontro de demandas de pesquisa em todas as esferas públicas. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a população terrestre vai chegar a 9 bilhões até 2050, portanto nas próximas décadas será preciso aumentar a produção de alimentos em 60% sem aumentar a degradação no planeta (FAO, 2013). Para tanto, a produção animal terá que se tornar mais eficiente. Na mesma medida, enfermidades que acarretam problemas reprodutivos nos animais devem ter suas situações avaliadas e controladas nas propriedades. Entre estas enfermidades, destaca-se a toxoplasmose, que é reconhecida como a principal causa de abortamentos em ovinos.

Toxoplasma gondii, o agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário cosmopolita responsável por prejuízos na pecuária e um importante agente de agravo em Saúde Pública. Causa enfermidade com graus variáveis de severidade em um grande número de mamíferos, que participam do ciclo de vida do agente como hospedeiros intermediários (ACHA; SZYFRES, 2003; DUBEY, 2009b).

Embora muitos aspectos sobre a toxoplasmose estejam esclarecidos, existem questões epidemiológicas e patológicas que ainda precisam de estudo, entre elas o problema da ocorrência de reinfecção com sintomatologia clínica nos ovinos, infecção transplacentária e a resposta imune envolvida neste processo.

O projeto que se apresenta aplica-se à reprodução experimental de infecções por *Toxoplasma gondii* em ovinos, com vistas a estudar aspectos relacionados à ocorrência da transmissão congênita nesta espécie animal.

Neste estudo foram avaliadas infecções produzidas por linhagens de *T. gondii* isoladas no Brasil, empregando oocistos esporulados como inóculo. Vale ressaltar que em todos os estudos de infecções experimentais com escopo semelhante ao deste foram utilizados isolados de *T. gondii* adaptados a modelos biológicos laboratoriais como inóculo e na maioria deles o desafio foi realizado por inoculação subcutânea de taquizoítos. Taquizoítos não são as formas usuais com as quais herbívoros são infectados por *T. gondii* na natureza. Este papel normalmente é desempenhado por outra forma infectante do parasito, o oocisto esporulado (DUBEY, 2010).

O trabalho ora proposto contribui com a geração de conhecimentos úteis para a formulação de programas de controle da toxoplasmose na ovinocultura. Uma vez que seja mais bem conhecido o papel de fêmeas infectadas na transmissão desta enfermidade, tomadas de decisões mais eficientes poderão ser adotadas quanto ao manejo sanitário em propriedades sob risco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Eucoccidiorida, Família Sarcocystidae e Sub-família Toxoplasmatinae. Foi primeiramente descrito por Nicolle e Manceaux (1908), na França e por Splendore (1908), no Brasil e seu ciclo de vida foi totalmente descrito em 1972, por Dubey e Frenkel. É uma importante zoonose de distribuição mundial, podendo infectar quase 200 espécies animais, entre mamíferos e aves (ACHA; SZYFRES, 2003). Na Holanda, *T. gondii* é considerado um dos três principais agentes transmitidos por alimentos contaminados com maior disseminação entre a população causando prejuízos econômicos aos sistemas de saúde (MANGEN et al., 2014), como observado em um surto recente de toxoplasmose aguda relatada em Araraquara, interior de São Paulo, em 2009 (EKMAN et al., 2012). O parasito está em quarto lugar na lista dos dez principais parasitas transmitidos pelos alimentos da FAO e OMS (Organização Mundial da Saúde) que cita a carne de pequenos ruminantes e de caça como fontes de infecção (FAO/WHO, 2014).

Os hospedeiros definitivos deste protozoário são o gato e outros felídeos, enquanto diversas espécies de animais homeotérmicos podem servir como hospedeiros intermediários. Sua transmissão pode ocorrer por três vias principais: por ingestão de oocistos eliminados por felídeos, que se tornam infectantes no ambiente, por consumo de carne mal cozida de hospedeiro intermediário contendo cistos teciduais viáveis do parasito e por via congênita (DUBEY, 2009a). Eventualmente, a transmissão pode ocorrer também pelas vias galactógena e venérea (LOPES et al., 2009a; LOPES et al., 2009b).

O ciclo de vida de *T. gondii* pode ser resumido como segue. Após ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, a parede do cisto é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e duodeno. Os bradizoítos contidos no interior dos cistos são liberados e penetram o epitélio intestinal, onde iniciam o processo de multiplicação por esquizogonia até que a fase sexuada do parasito toma lugar, quando merozoítos formados durante a fase

assexuada iniciam a formação de gamontes (microgamontes e macrogamontes). Microgamontes fecundam macrogamontes para a formação de oocistos, que são liberados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo. No meio ambiente ocorrerá a esporulação, quando os oocistos sofrem meiose para formação de oito esporozoítos haploides. Nesta fase os oocistos se tornam extremamente infectantes e, se ingeridos pelo hospedeiro intermediário, ocorrerá excistamento dos esporozoítos no intestino delgado. Neste sítio, os esporozoítos penetram os enterócitos e são carregados até a lâmina própria e eventualmente para corrente sanguínea da circulação periférica. Na lâmina própria se dividem em taquizoítos, que ativamente alcançarão a corrente sanguínea para se multiplicar em outros tecidos, como linfonodos, cérebro, olhos, diafragma, músculos somáticos e órgãos reprodutivos. Nesses tecidos, os taquizoítos se desenvolverão para sua forma de persistência, os bradizoítos, que permanecem dentro de cistos (DUBEY, 2010).

Como um único parasita pode produzir ambos micro e macrogametas que se reproduzem, a recombinação de genótipos ocorre em situações raras, quando um felino se infecta simultaneamente ou em rápida sucessão com diferentes isolados (SIBLEY; AJIOKA, 2008). Quando a coinfecção ocorre, uma miríade de novos organismos geneticamente distintos é criada. Os novos genótipos mais aptos podem se expandir mais rapidamente através da reprodução sexuada em felinos (WENDTE et al., 2010). Estima-se que há cerca de 10.000 anos, houve uma variação da população de *T. gondii* a partir de 8 linhagens fundadoras, porém de formas diferentes em algumas regiões do planeta, com expansão clonais e sexuadas. Para fins de caracterização e comparação as populações de diferentes partes do mundo foram analisadas geneticamente e agrupadas em seis grandes Ramos ("clades" A até F), os quais contêm 15 haplogrupos (HP) ou genótipos (SU et al., 2012). Inicialmente, a análise dos genótipos existentes revelou que a maioria dos isolados da Europa e da América do Norte pertence a três haplótipos clonais distintos, os tipos I, II e III (HOWE; SIBLEY, 1995), considerado clássicos. Particularmente na América do Sul, isolados com combinações de alelos novas ou atípicas foram descritos (KHAN et al., 2007; SILVA et al., 2011), provavelmente devido à maior frequência de recombinação sexuada no hospedeiro definitivo e manutenção de genes com maiores vantagens seletivas, porém com mesma ancestralidade dos genótipos europeus e norte-americanos (MINOT et al., 2012).

A linhagem clonal do tipo II é a mais comumente encontrada na Europa e na América do Norte (AJZENBERG et al., 2002, 2004). Na África, foram relatados isolados do tipo clássico II, III e alguns atípicos (GEBREMEDHIN et al., 2014). Já no Brasil, observa-se ausência do tipo II e predominância de genótipos atípicos, sendo os mais comuns BrI, BrII e BrIII (PENA et al., 2008). Esses genótipos diferenciados e não clonais podem causar síndrome infecciosa severa com comprometimento pulmonar, inclusive em humanos imunocompetentes, sendo por isso considerada uma enfermidade emergente em países tropicais (CARME et al., 2002; DEMAR et al., 2007; CARME et al., 2009; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009). Ajzenberg et al. (2002) sugerem que o genótipo do parasita pode influenciar a ocorrência de toxoplasmose congênita (TC) em humanos. Outros pesquisadores também mencionam a hipótese de maior patogenicidade de cepas atípicas comparando-se com as clássicas na TC (DELHAES, 2010).

Atualmente, alguns grupos de pesquisa de toxoplasmose em humanos tem observado grande implicação do parasita, especialmente *T. gondii* de genótipos atípicos, no desenvolvimento de doença ocular (TO), congênita ou adquirida, seja por melhorias nas técnicas de diagnóstico e/ou aumento da incidência da enfermidade (LOPES et al., 2008; HERMANN et al., 2014; MENDES et al., 2014). Um trabalho mais aprofundado para avaliação dos genótipos envolvidos foi realizado por Khan et al. (2006) utilizando tipificação através de análise multilocus em pacientes brasileiros com TO, que revelaram uma alta diversidade de genótipos, principalmente de tipos I/III. Com relação à toxoplasmose congênita, um grupo de pesquisa do Instituto de Medicina Tropical tem obtido resultados analisando o líquido amniótico de pacientes com toxoplasmose, sendo que a maior ocorrência relatada foi de genótipos não clonais (TARGA, 2012; SHIMOKAWA, 2013). Em uma extensa revisão realizada por Dubey et al. (2012), aponta-se que os grupos de pesquisa de toxoplasmose em humanos utilizam diferentes marcadores moleculares para comparação dos genótipos e há necessidade de estudos de isolamento do parasita em larga escala para determinar qual genótipo está mais relacionado com a enfermidade no Brasil.

Além dessa recente diferenciação dos genótipos de *T. gondii* através das características moleculares, também é realizada a classificação dos isolados de acordo com a patogenicidade da cepa inoculada em camundongos albinos suíços. As cepas do tipo I são patogênicas, provocando a morte dos camundongos em menos de 10 dias após a inoculação de 10 taquizoítos, com apresentação de sintomatologia clínica severa devido ao elevado

nível de parasitemia e disseminação pelos tecidos. As cepas do tipo II são cistogênicas e pouco patogênicas, induzindo infecção crônica com formação de cistos cerebrais e soroconversão nos camundongos após inoculação de taquizoítos, não interferindo com seu tempo de vida. Cepas do tipo III apresentam patogenicidade intermediária, sendo que os camundongos inoculados podem apresentar sintomas da enfermidade e ter seu tempo de vida reduzido, com formação de cistos do parasita no cérebro (DUBEY; FRENKEL, 1976; DUBEY et al., 1998; DARDE, 2008).

2.2 TOXOPLASMOSE EM OVINOS

Toxoplasma gondii é apontado como causa primária de doença congênita, abortamentos e natimortalidade em humanos e em animais de produção (WATSON; BEVERLEY, 1971; DUBEY; BEATTIE, 1988). Nas doenças congênitas são comuns manifestações neurológicas de diversas naturezas como doença ocular e hidrocefalia (WEISS; DUBEY, 2009).

Nem sempre infecções por *T. gondii* resultam em manifestações clínicas. Ao contrário, é bastante frequente a ocorrência de infecções assintomáticas tanto em animais como em seres humanos. Com efeito, valores de prevalência da infecção entre 30 e 40% são comuns em muitas espécies (DUBEY; BEATTIE, 1988; TENTER, 2000).

Estudos de soroprevalência no Brasil mostram que nos ovinos ela varia entre 20 e 50%, mas está disseminada em mais da metade dos rebanhos analisados (MEIRELES et al., 2003; FIGLIUOLO et al., 2004; RAGOZO et al., 2008; SOARES et al., 2009; UENO et al., 2009; LANGONI et al., 2011). Especificamente no Estado de Alagoas, Pinheiro et al. (2009) observaram prevalência de 32,9% utilizando a RIFI com um ponto de corte de 64. Com a mesma técnica, porém no Estado do Rio de Janeiro, Luciano et al. (2011) relataram prevalência de 38,05%. Um valor menor foi obtido em um estudo que utilizou a técnica de soroaglutinação em latex para análise das amostras, tendo obtido prevalência de 18,75% de animais soropositivos (GONDIM et al., 1999). Por outro lado, uma alta soroprevalência foi observada no Estado do Paraná, onde se observou prevalência de 51,5% em ovinos, utilizando a RIFI (ROMANELLI et al., 2007). Um estudo recente de ocorrência, novamente no

Rio de Janeiro, utilizando o teste de aglutinação modificado (MAT), verificou soropositividade em 53,3% (n=379) dos ovinos estudados, sendo que a maioria apresentava altos títulos de anticorpos (COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014). A utilização de técnicas sorológicas combinadas para aumentar a sensibilidade diagnóstica, principalmente para detecção de animais soropositivos, porém com baixos títulos de anticorpos, revelou uma taxa de infecção de 63% em Uberlândia, Minas Gerais (ROSSI et al., 2011).

A soroprevalência aumenta com a idade dos animais, alcançando 95% em ovelhas com mais de 6 anos em alguns rebanhos (DUBEY; KIRKBRIDE, 1989). Além da idade, outros fatores de risco para ocorrência de infecção por *T. gondii* observados em ovinoculturas foram a presença de abortamentos, o uso de coleções líquidas naturais como fonte de água para os animais, manejo semi-intensivo e propriedade com grandes áreas (DUBEY, 2010).

A toxoplasmose em ovinos costuma se manifestar clinicamente após a primoinfecção de uma fêmea prenhe. Os ovinos normalmente se infectam com oocistos esporulados disponíveis no ambiente. Após a ingestão de oocistos, estes existem no sistema digestório dos animais liberando esporozoítos que após invadirem células epiteliais logo se diferenciam em taquizoítos que se disseminam pelo organismo invadindo outras células. Nesta fase, os efeitos clínicos mais notáveis são elevação da temperatura corporal por cerca de uma semana (DUBEY; SHARMA, 1980). Em uma fêmea prenhe, o parasito infecta a placenta, parasitando as carúnculas maternas nos placentomas e alcançando as células trofoblásticas fetais adjacentes (transmissão transplacentária). Após se multiplicarem nestes tecidos, o parasito infecta outros tecidos fetais, produzindo sinais como abortamentos, natimortalidade e nascimento de cordeiros debilitados. Lesões placentárias decorrentes da infecção toxoplásmica com pontos brancos e áreas de necrose incapacitam o órgão para manutenção da gestação (BUXTON, 1990). Esses focos de necrose caseosa envolvem ambos vilos maternos e fetais, podendo mostrar mineralização (DUBEY, 2010).

Dependendo do estágio da gestação em que a transmissão transplacentária ocorre, os efeitos podem ser diferentes. Infecções no início da gestação normalmente levam à morte fetal, enquanto infecções durante o meio da gestação redundam em natimortalidade ou nascimentos de animais debilitados e infecções nos períodos finais da gestação levam ao nascimento de animais infectados, mas clinicamente saudáveis (BUXTON et al., 2006). Ovelhas gestantes experimentalmente infectadas com oocistos via oral desenvolvem febre e

alterações respiratórias, recuperando-se até 2 semanas após a infecção. Algumas ovelhas podem abortar durante a fase aguda da infecção (7-14 dias), por causas inespecíficas, provavelmente devido à pirexia e desregulação hormonal. Pela administração de 100 ou mais oocistos infectantes a ovelhas em período intermediário da gestação (60-90 dias), os animais poderão abortar um mês após a infecção, de maneira geral (DUBEY, 2010).

Toxoplasma gondii tem capacidade de afetar a esfera reprodutiva de ovelhas em decorrência da modificação do sistema imune durante a gestação. O sistema imunológico da fêmea é modulado durante esse período de forma a prevenir a rejeição do feto. Este efeito é alcançado com a depleção da síntese de mediadores pró-inflamatórios como interleucina 2 e interferon gama, o que favorece o estabelecimento e multiplicação de *T. gondii* no ambiente placentário (INNES; VERMEULEN, 2006).

Em ovinos, a transmissão transplacentária também pode ocorrer após recrudescência de uma infecção persistente endógena (infecção latente). Neste caso, a fêmea ovina já se encontra infectada por *T. gondii* antes da concepção e, durante a gestação, ocorre uma reativação da infecção toxoplásmica latente e então a transmissão transplacentária toma lugar (INNES et al., 2009).

Esta condição, transmissão transplacentária decorrente de recrudescência de uma infecção persistente em ovinos, é objeto de intenso debate na comunidade científica atualmente.

Neste campo, duas vertentes antagônicas são reconhecidas. Alguns grupos de pesquisa afirmam que ovelhas sofrem problemas reprodutivos somente após a primo-infecção, pois uma vez infectadas produzem resposta imune celular eficiente e duradoura que impede a ocorrência de transmissão congênita, ou fazem com que este evento seja raro (BUXTON et al., 2001; RODGER et al., 2006; INNES et al., 2009). Outra linha sugere haver evidências de que uma infecção primária não confere proteção para as progênes subsequentes, existindo o risco de transmissão vertical nos animais cronicamente infectados (DUNCANSON et al., 2001; WILLIAMS et al., 2005; MORLEY et al., 2008; HIDE et al., 2009). Neste caso, a primo-infecção produziria uma resposta imune que não impediria que a reativação da infecção latente levasse a uma transmissão congênita, de forma que fêmeas ovinas infectadas antes da gestação estariam sob risco de abortamento com maior frequência.

Estudos com ovinos naturalmente infectados mostram que a transmissão vertical ocorre em menos de 4% das gestações (RODGER et al., 2006). Neste caso, apenas dois cordeiros nascidos vivos (filhos de uma mesma fêmea) apresentaram anticorpos pré-colostrais anti- *T. gondii*, de um total de 31 fêmeas soropositivas pesquisadas. DNA do parasito ou evidência histopatológica de infecção não foi encontrado em nenhum dos seis cordeiros natimortos filhos das demais fêmeas soropositivas, indicando que a transmissão transplacentária é um evento raro.

Da mesma forma, 26 fêmeas infectadas por *T. gondii* previamente à concepção pariram 24 cordeiros vivos e livres da infecção. Apenas uma fêmea neste experimento abortou dois gêmeos (WATSON; BEVERLEY, 1971). Na Austrália, um grupo de 135 fêmeas persistentemente infectadas pariu 178 cordeiros vivos, todos sem apresentar títulos pré-colostrais anti-*T. gondii*. Em apenas uma fêmea deste grupo *T. gondii* foi isolado de tecidos placentários (MUNDAY, 1972).

Por outro lado, investigações realizadas por meio de diagnóstico molecular revelaram que nove entre 29 ovelhas naturalmente infectadas tiveram dois partos consecutivos nos quais *T. gondii* foi detectado nos produtos (MORLEY et al., 2008). Mais ainda, neste trabalho, abortamentos em gestações consecutivas com detecção de DNA de *T. gondii* foram verificados em seis fêmeas. Estes resultados mostram que a transmissão congênita em gestações consecutivas pode ocorrer em níveis bem mais elevados do que os esperados, o que é incompatível com a hipótese de que infecção prévia por *T. gondii* protege a ovelha de abortamentos e transmissões congênitas nas gestações posteriores.

Se a transmissão vertical ocorre em níveis relevantes em ovinos, é esperada uma distribuição não aleatória de prevalências entre diferentes famílias de ovelhas, caso estas famílias estejam expostas ao mesmo risco de adquirir *T. gondii* do ambiente (via oocisto). Com efeito, o teste desta hipótese revelou diferenças marcantes na prevalência de infecção por *T. gondii* em diferentes famílias de ovelhas de uma mesma propriedade. A frequência de abortamentos também diferiu marcadamente entre as diferentes famílias estudadas e teve uma elevada correlação com a prevalência de infecção por *T. gondii* (MORLEY et al., 2008). Por estes resultados, os autores inferem que a transmissão vertical ocorre com frequência significativa em determinadas famílias gerando elevadas frequências de abortamentos, o

que sugere que ovelhas previamente infectadas também estão expostas ao risco de sofrer perdas reprodutivas assim como ovelhas que nunca se infectaram com o parasito.

As pesquisas que revelam a elevada frequência de ocorrência de transmissão vertical em ovinos são criticadas quanto à forma com que este evento vem sendo demonstrado, baseando-se apenas em resultados de diagnósticos moleculares e sem evidências de lesões histopatológicas, de conversão sorológica ou isolamento do agente (BUXTON et al., 2007; INNES et al., 2009). Em contrapartida, os autores (MORLEY et al., 2008) que ressaltam que a importância da transmissão congênita de *T. gondii* em ovinos é subestimada discutem que a ausência de evidências histopatológicas não necessariamente indica ausência do parasito e que a produção de imunoglobulinas pode ser suprimida por vários meses nos casos de toxoplasmose congênita (DESMONTS et al., 1981; REMINGTON; DESMONT, 1990).

Ainda, Morley et al. (2008) apontam que diferentes variantes de *T. gondii* podem ter distintos comportamentos biológicos quanto à forma de transmissão, virulência e capacidade de causar abortamentos em gestações sucessivas, como já sugerido anteriormente (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Esse comportamento distinto foi testado em um estudo realizado na Escócia (KATZER et al., 2014), onde foi analisada a taxa de infecção pelo *T. gondii* em animais vacinados e posteriormente desafiados com um genótipo diferente do parasita. Cordeiros foram imunizados subcutaneamente com taquizoítos de cepa laboratorial do tipo I e 4 semanas depois infectados oralmente com oocistos de isolado de campo do genótipo II. Foi relatada que a vacinação não preveniu a infecção subsequente, mas diminuiu significativamente a carga parasitária nos tecidos dos ovinos.

Finalmente, é importante lembrar que dois mecanismos podem levar à transmissão congênita. Num primeiro caso, o parasito pode ser transmitido ao feto a partir da recrudescência da infecção materna pré-existente durante sucessivas gestações (transmissão transplacentária endógena) ou novas infecções podem ser adquiridas repetidamente durante ou entre gestações (transmissão transplacentária exógena) (TREES; WILLIAMS, 2005). Estas duas possibilidades podem ocorrer com diferentes frequências em ovinos e devem ser consideradas em experimentos que reproduzem a transmissão vertical.

Com relação aos genótipos de *T. gondii* observados com maior frequência em ovinos, poucos estudos de genotipagem foram realizados. Segundo Dubey (2010), na Europa o genótipo mais observado em ovinos é o tipo clonal II, seguido por uma proporção bem

menor do tipo III. No Brasil, Ragozo et al. (2008) apontaram maior ocorrência dos genótipos atípicos BrI e BrIII. Em um extenso trabalho de caracterização de isolados de animais domésticos no Brasil, Pena et al. (2008) descreveram como mais comuns o genótipo BrI, seguido dos genótipos BrII e BrIII.

Além dos efeitos da toxoplasmose para a saúde ovina, há que se considerar o papel da carne para a saúde pública, no caso de transmissão congênita subclínica, onde o cordeiro nasce infectado pela mãe, porém clinicamente saudável. Não está estabelecida ainda nenhuma taxa de transmissão congênita subclínica, mas acredita-se que menos de 2% dos ovinos se tornem congenitamente infectados com *T. gondii* (DUBEY, 2010). Dubey e Kirkbride (1989) mostraram altos índices de soroconversão (59,6%) em cordeiros nascidos de ovelhas soropositivas de um rebanho na Dakota do Sul, com títulos altos quatro meses após o nascimento, indicando infecção ativa. Na Etiópia foi possível observar uma alta taxa de isolamento de *T. gondii* de pequenos ruminantes abatidos para consumo humano, ou seja, constatou-se a presença de parasitos viáveis infectantes (GEBREMEDHIN et al., 2014).

Questionamentos persistem quanto à importância da transmissão congênita da toxoplasmose nos ovinos no Brasil e se a maior ocorrência dos genótipos atípicos e mais patogênicos acarreta maiores consequências à saúde animal e humana. Atualmente, preconiza-se a identificação e estratificação de ovinos soropositivos para *T. gondii* em um rebanho ovino, porém mantendo-os em atividade reprodutiva. É discutida a hipótese de que existe significância do papel dos genótipos na patogenicidade e transmissão da enfermidade após reinfecção.

2.3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O trabalho visou os seguintes objetivos:

1. Avaliar aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos de reinfecção de ovelhas gestantes cronicamente infectadas por *T. gondii* utilizando oocistos esporulados originados de isolados de campo, pertencentes à mesma linhagem genética, como inóculo na primo-infecção e na reinfecção;

2. Avaliar aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos da reinfecção de ovelhas gestantes cronicamente infectadas por *T. gondii* utilizando como inóculo na primo-infecção e na reinfecção oocistos esporulados originados de isolados de campo pertencentes a linhagens genéticas distintas;
3. Propor medidas de controle com relação às fêmeas infectadas e à transmissão congênita relativas à toxoplasmose em ovinos.

Com o primeiro e o segundo objetivo pretende-se verificar se ovinos podem sofrer transmissão transplacentária exógena. O efeito da reinfecção com cepas distintas ou com cepas idênticas às da primo-infecção será comparado.

A transmissão transplacentária endógena poderá ser verificada com o experimento a ser realizado para atender ao objetivo no. 2. Neste caso, os produtos das gestações serão testados por provas biológicas e moleculares que permitirão verificar qual cepa de *T. gondii* foi encontrada, se a utilizada como inóculo da primo-infecção ou se aquela empregada como inóculo da reinfecção. No primeiro caso, configurar-se-ia um caso de transmissão transplacentária endógena e no segundo, de transmissão transplacentária exógena.

Finalmente, o conhecimento dos resultados obtidos fornecerá subsídios para formulação de propostas de controles para esta importante zoonose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE INÓCULO DE *TOXOPLASMA GONDII*

3.1.1 Reativação de isolados de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* previamente obtidos de felinos de centros de zoonoses, já caracterizados molecularmente, encontravam-se criopreservados com DMSO (dimetil sulfoxido) em nitrogênio líquido nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do VPS/FMVZ/USP. Foram selecionados dois isolados de duas variantes moleculares de *T. gondii*, designados de TgCatBr71 (genótipo #6 ou BrI) e TgCatBr60 (genótipo #8 ou BrIII), por possuírem elevada diversidade genética, diferentes letalidades para camundongos e serem dois dos genótipos encontrados com maior frequência em animais domésticos no país (DUBEY et al., 2012; PENA et al., 2006; RAGOZO et al., 2010). As figuras a seguir mostram os genótipos de *T. gondii* que foram usados neste experimento. A figura 1 foi retirada de Ragozo et al. (2010). A numeração dos genótipos de *T. gondii* empregada por Ragozo et al. (2010) difere daquela adotada no banco de dados <http://toxodb.org/toxo/>.

Figura 1 - Genótipo multilocus dos isolados de *T. gondii* empregados neste estudo (em destaque)

Isolate ID ^a	County – state	PCR-RFLP genotype												Identity with other isolates from Brazil (state)	Genotypes (virulence ^b)
		SAG1	5'3' SAG2 ^c	SAG2 ^d	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3 ^e		
TgShBr8	Botucatu – SP	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	I	TgCatBr2, 12, 17, 21, 30 (PR) ^f TgCatBr47, 53, 54, 55, 62, 71, 75 (SP) ^g TgDgBr3, 7 (SP) ^h	#1
TgShBr9	Botucatu – SP													TgCkBr10 (SP) ^j	Type BrI (virulent)
TgShBr10	Coronel Macedo – SP													TgCkBr55, 79, 86, 87 (RJ) ^j	
TgShBr11	Dracena – SP													TgCkBr98, 101, 102, 104 (PR) ^j	
TgGtBr2	Botucatu – SP													TgCkBr123, 124 (RO) ^j TgCkBr144 (PA) ^j TgCpBr114 (SP) ^k	
TgGtBr3	Botucatu – SP														
TgGtBr4	Botucatu – SP														
TgGtBr9	Botucatu – SP														
TgShBr15	Tietê – SP	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III	TgCatBr3, 4 (PR) ^l TgCatBr58, 59, 60, 73, 74 (SP) TgDgBr4, 12 (86) (SP) TgCkBr131, 132, 133, 134 (RO) TgCkBr7, 11, 17 (SP) TgCpBr17, 18, 20, 36 (SP)	#2 Type BrIII (Non-virulent)

Fonte: Ragozo et al. (2010).

A figura 2 mostra o padrão internacional dos isolados no site ToxoDB.

Figura 2 - Genótipo multilocus dos isolados de *T. gondii* empregados neste estudo (em destaque)

Identify Isolates based on RFLP Genotype Number												
Shown below is a table of identified RFLP Genotypes (Chunlei Su). Use the check boxes on the left to search for associated isolates. Click here for RFLP images in PDF format.												
Genotype#	SAG1	SAG2	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	Virulence
1	II or III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Non
2	II or III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Non
3	II or III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	Non
4	II or III	II	II	II	II	II	II	II	I	II	I	Non
5	u-1	II	II	II	II	II	II	II	I	II	I	Non
6	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	Vir
7	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	Non
8	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	Non

Fonte: <http://toxodb.org/toxo/> (2011).

A figura 3 mostra a diversidade genética entre diversos isolados de *T. gondii*, incluindo as cepas usadas neste experimento (PENA et al., 2008).

Figura 3 - Rede filogenética mostrando a divergências entre os genótipos BrI e BrIII, ambos empregados no experimento presente (setas)

Fonte: Pena et al. (2008).

As amostras foram submetidas a descongelamento rápido a 37°C e posteriormente centrifugadas a 500G por 10 minutos a 4°C após adição de 4 mL de soro fetal bovino para

neutralização do conservante DMSO. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em solução salina estéril.

Cinquenta fêmeas de camundongos suíços albinos provenientes do biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP foram inoculadas pela via subcutânea com 1mL das suspensões de taquizoítos, formando dois grupos de 25 animais cada, inoculados com as amostras de *T. gondii* acima descritas. Camundongos inoculados com isolados patogênicos (genótipo I) foram mantidos vivos através de tratamento oral via água de beber com sulfadiazina sódica (125mg/100mL de água) durante 21 dias. Um camundongo de cada grupo foi sacrificado dois meses após a inoculação, através de câmara de CO₂, para pesquisa de presença de anticorpos anti-*T. gondii* e para detecção de cistos no cérebro. Este procedimento visa verificar se os animais adquiriram infecção por *T. gondii* após a inoculação, permanecendo cronicamente infectados.

No final do procedimento obtiveram-se 20 camundongos com infecção latente por *T. gondii*, sendo 10 de cada isolado. A totalidade desses animais foi necropsiada após sacrifício em câmara de CO₂ (CEUA FMVZ/USP nº2351/2011) e seus tecidos encefálicos foram recolhidos para uso posterior, no bioensaio em gatos. O bioensaio em camundongos foi realizado no infectório do VPS/FMVZ-USP de São Paulo.

3.1.2 Bioensaio em gatos

Seis gatos SRD com idades entre três e seis meses, e negativos sorologicamente para *N. caninum* e *T. gondii* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foram previamente vermifugados, vacinados e mantidos em duas baias teladas coletivas, cada uma hospedando três animais. Os felinos foram mantidos no biotério do VPS/FMVZ/USP Pirassununga/SP recebendo água *ad libitum* e ração comercial em quantidade adequada. Os animais foram originados de ninhadas produzidas por dois casais de gatos reprodutores doados pela empresa Biovet®. Após o experimento, todos foram castrados e entregues para adoção (CEUA FMVZ/USP nº2351/2011).

De acordo com protocolo previamente utilizado (SAKAMOTO et al., 2009) material encefálico fresco de camundongos infectados com *T. gondii*, obtido como já descrito no item 2.1.1, foi recolhido em necropsia e oferecido a três gatos, no caso do isolado TgCatBr74. Outros três gatos receberam material de TgCatBr60. Cada gato foi alimentado com dois cérebros de camundongos positivos e as carcaças desses camundongos foram oferecidas após a ingestão do cérebro, sendo que todos os gatos ingeriram pelo menos uma carcaça de camundongo infectado com *T. gondii*.

Antes da oferta de cérebros, os animais foram transferidos das baias teladas para gaiolas individuais (70cm x 70cm x 40 cm). Gatos que receberam isolados diferentes foram mantidos e manejados separadamente em períodos diferentes para evitar contaminação cruzada. Também com esse objetivo, equipes diferentes de pessoas foram encarregadas do trato de cada grupo. Para descontaminação, todo o material de limpeza e a bandeja das gaiolas foram limpos diariamente utilizando água a 100°C.

Imediatamente após a ingestão do cérebro, os gatos receberam a aplicação de 1ml de dexametasona (Azium®2mg/mL) intramuscular em dose única, com finalidade imunodepressora. Quando possível também foi realizada coleta de sangue intravenoso jugular no dia zero, no dia do início de eliminação de oocistos pelas fezes, no dia 7 e no dia 14 após a infecção oral. Durante duas semanas após a inoculação, as fezes desses animais foram coletadas diariamente e examinadas por meio da técnica de flutuação em solução de sacarose ($d = 1,203$) (OGASSAWARA; BENASSI, 1980), para pesquisa de oocistos de *T. gondii*. O volume total de fezes de cada gaiola foi coletado duas vezes ao dia e cerca de um grama do material total de cada gato foi homogeneizado, diluído em solução de sacarose, filtrado em gaze e centrifugado a 640G por 10 minutos. A camada na superfície da solução foi coletada com alça estéril e examinada com auxílio de microscopia óptica. O restante das fezes foi reservado e guardado em geladeira. Quando observados oocistos do tipo *Toxoplasma/Neospora/Hammondia*, o material foi lavado com tampão Tris-EDTA e centrifugado durante 10 minutos a 10000G e 4°C, estocados em freezer a -4°C, para posterior análise por métodos moleculares.

As fezes de cada gato contendo oocistos foram homogeneizadas e lavadas separadamente. As fezes totais foram lavadas com cerca de 200mL de água destilada, filtradas em gaze estéril e o filtrado foi transferido para tubos tipo Falcon® estéreis de 50mL,

sendo submetidos à centrifugação por 10 minutos a 640G, à 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em solução de sacarose, cerca de 3 a 4 vezes a quantidade de sedimento, homogeneizado e novamente centrifugado a 640G por 10 minutos a 4°C. Cerca de 5 a 10mL do sobrenadante eram transferidos para um novo tubo tipo Falcon® de 50 mL, sendo acrescido de água destilada até a compleição do volume e levado para a última centrifugação, similar à precedente.

O sobrenadante foi desprezado, o sedimento de cada tubo foi reunido em um frasco tipo Schott® de 200mL e ressuspensionado em 5 a 10 mL de ácido sulfúrico 2% que permaneceu em estufa B.O.D. sob temperatura de 25-26°C, durante sete a vinte dias, para que ocorresse a esporulação. Após esse período, o sedimento formado foi concentrado por centrifugação, para retirada do ácido, e uma alíquota padronizada foi separada para contagem em câmara hematómica e determinação da concentração de oocistos. O material foi mantido em suspensão de antibiótico e antimicótico a 4°C até o momento da inoculação nos ovinos. O bioensaio em gatos ocorreu nos laboratórios do VPS/FMVZ/USP Pirassununga, SP.

3.1.3 Teste de Viabilidade de Oocistos

Foi realizado teste de viabilidade dos oocistos esporulados, através de inoculação via oral em camundongos suíços albinos não sensibilizados ao *T. gondii*. Foram utilizados dez camundongos para cada um dos isolado obtidos, sendo que eles receberam cerca de 50 oocistos cada. Os oocistos na solução de H₂SO₄ 2% foram homogeneizados, sendo pipetada quantidade suficiente para os inóculos de ambos os camundongos. As amostras foram lavadas em solução salina 0,8% autoclavada e centrifugadas a 12000G durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspensionado em solução de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico) em quantidade suficiente para resultar em um inóculo de 30µL por camundongo. Os camundongos foram observados diariamente após a inoculação, sendo anotada a ocorrência de sintomatologia clínica e/ou mortalidade. Os animais que sobreviveram até o 21º dia após a inoculação foram sacrificados utilizando câmara de CO₂ para coleta de material encefálico e posterior visualização de cistos teciduais.

3.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVELHAS

3.2.1 Primeira infecção com *T. gondii*

Dezoito borregas e dois carneiros de cerca de um ano, da raça Santa Inês, soronegativos para a infecção por *N. caninum* e *T. gondii*, foram adquiridas de um criatório de confiança (Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP), transportadas até o local do experimento e mantidas em quarentena durante dois meses até o início do experimento. Permaneceram em baias de cimento teladas e cercadas, onde foram observadas diariamente, passaram a receber alimentação controlada (silagem de milho e ração de manutenção), foram imunizadas com vacina antirrábica e tiveram acompanhamento parasitário, através de contagem de OPG (UENO; GONÇALVES, 1998) e método FAMACHA® (VAN WYK; BATH, 2002) para controle de verminoses, com objetivo de obtenção de animais hígidos para o experimento, sendo vermifugadas somente quando necessário. As baias continham bebedouros plásticos que eram limpos diariamente, onde era fornecida água encanada tratada. O número de animais no estudo foi determinado por conveniência, sendo o maior possível para se adequar às condições das instalações disponíveis, em um espaço controlado e protegido. Foi colhido material destes animais para que fosse excluída a possibilidade de ocorrência de sintomatologia clínica em decorrência de outras enfermidades causadoras de abortamento. Foram realizadas análises sorológicas para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus*, *B. ovis* e *Leptospira* spp. Esses testes foram realizados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS/FMVZ/USP.

Foram empregados animais pertencentes a apenas uma raça para evitar viés relacionado a diferentes suscetibilidades que as linhagens poderiam apresentar frente à infecção por *T. gondii*. A seleção da raça seguiu critérios de melhor adaptabilidade e utilização na região do estudo, além da questão de facilidade na aquisição dos animais, em relação a preço e disponibilidade.

Uma vez consideradas aptas a participarem do experimento, as ovelhas foram divididas em quatro grupos, conforme descrito:

- Grupo 1: formado por quatro animais divididos em duas baias que foram primo-infectados com oocistos de *T. gondii* do genótipo BrI e posteriormente foram re-infectados com oocistos BrIII;
- Grupo 2: composto de cinco animais divididos em duas baias que foram primo-infectados com oocistos BrIII e posteriormente foram re-infectados com oocistos BrI;
- Grupo 3: formado por quatro animais que foram divididos em duas baias e receberam como primeiro inóculo, oocistos BrIII posteriormente foram re-infectadas com a mesma amostra;
- Grupo 4: composto por 5 animais divididos em duas baias e pertencentes ao grupo controle, não infectado.

Os oocistos obtidos conforme item 3.1.2 foram utilizados como o inóculo para as borregas dos grupos 1, 2 e 3. A partir da suspensão de oocistos estocada foi aliquotado um volume que continha 2.000 oocistos, ao qual foi adicionado um volume adequado de solução salina fisiológica e a inoculação nos ovinos foi realizada com auxílio de uma sonda esofágica.

A primo-infecção dos animais foi realizada em dose única e após a inoculação os animais permaneceram confinados e foram avaliados clinicamente. Os animais do Grupo 4 receberam somente solução salina fisiológica por meio da sonda. Foram considerados cronicamente infectados os animais que apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii* após dois meses de infecção, utilizando a RIFI (título ≥ 64).

A avaliação clínica dos animais foi feita da seguinte maneira: aferição de temperatura retal diariamente nos primeiros 15 dias pós-infecção (D₀-D₁₅); palpação de linfonodos diariamente nos primeiros 15 dias pós-infecção; colheita de soro para RIFI semanalmente durante o primeiro mês pós-infecção, depois quinzenalmente até o terceiro mês e mensalmente até a realização da segunda infecção.

3.2.2 Reprodução

Quatro meses após a cronificação decorrente da primo-infecção com a primeira infecção de *T. gondii* utilizada nos grupos 1, 2 e 3, as ovelhas de todos os grupos foram emprenhadas por monta natural utilizando os dois carneiros adquiridos previamente. Para tanto, o protocolo a seguir foi utilizado. O cio dos animais foi sincronizado utilizando implante intravaginal (CIDR®) e aplicações intramusculares de estrógeno e progesterona. No primeiro dia de aplicação dos implantes, as ovelhas receberam 0,4 mL de estrógeno intramuscular e permaneceram seis dias com o CIDR®. No sexto dia, o implante foi retirado e os animais receberam outra dose de estrógeno, além de 250 a 300 UI de progesterona via injeção intramuscular. No dia seguinte, elas foram deixadas com o macho, permanecendo com ele por cinco dias (FLEISCH et al., 2012). A prenhez foi confirmada por métodos ultrassonográficos, cerca de 21 dias após a monta natural.

No caso de repetição de cio, o mesmo protocolo era realizado novamente. Cada ovelha possuía uma ficha de identificação com o registro exato do diagnóstico de gestação por meio ultrassonográfico e do período da monta que antecedeu este registro. Assim, a idade de gestação de cada animal pôde ser conhecida com precisão de cinco dias de intervalo.

3.2.3 Segunda infecção com *T. gondii*

Quando as ovelhas dos grupos 1, 2 e 3 alcançaram cerca de 60 dias de gestação, fase considerada como período gestacional intermediário nessa espécie, elas foram submetidas à re-inoculação com 2×10^3 oocistos de *T. gondii*, conforme já descrito, e as do grupo 4 novamente receberam solução salina fisiológica. A idade gestacional para o desafio foi estabelecida conforme dados de literatura, que relatam ocorrência de reabsorção fetal e repetição de cio quando as ovelhas são infectadas no início da gestação, abortamentos na fase intermediária e má formação fetal e natimortalidade em fases mais avançadas da

prenhez (BUXTON, 1990). Visou-se trabalhar com a possibilidade maior de abortamentos, que seria um evento mais prático de se verificar e avaliar, por isso a escolha do período intermediário de gestação. Além disso, a visualização ultrassonográfica dos batimentos cardíacos fetais é realizada com maior garantia em torno de 8 semanas de gestação e esse parâmetro foi utilizado para detectar a viabilidade dos fetos durante o experimento.

O seguinte fluxograma de atividades foi realizado (Figura 4):

Figura 4 - Fluxograma cronológico de atividades realizadas.

Fonte: (SOARES, R. M., 2013).

Legenda: **(1)** primeira inoculação: animal é experimentalmente infectado e segue não prenhe por 135 dias; **(2)** cobertura: animal é cruzado, tem o diagnóstico de gestação confirmado e segue prenhe por 60 dias; **(3)** segunda infecção: animal é experimentalmente infectado com oocistos de *T. gondii* pela segunda vez e segue prenhe até a hora do parto.

Uma semana antes da reinfecção, no dia da reinfecção (D_0') e semanalmente após a segunda inoculação foram realizadas avaliações de parâmetros clínicos (temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória, palpação de linfonodos e coloração de mucosas), coleta de sangue venoso para realização de análises clínicas e sorológicas, além da avaliação ultrassonográfica para checagem da viabilidade do feto. Somente no caso da verificação da temperatura dos animais o procedimento foi realizado diariamente nos primeiros 30 dias após a re-inoculação. No D_7' , foi feita coleta de sangue total em frascos com conservante/anticoagulante citrato dos animais de todos os grupos, e armazenado a - 20°C para posterior análise por métodos de biologia molecular.

As gestações foram acompanhadas diuturnamente, para que fosse possível observar a ocorrência de abortamentos ou nascimentos, com propósito tanto de coleta de material fresco quanto para evitar que os cordeiros ingerissem o colostro, sendo que, para isso, foram separados da mãe assim que nasceram. Ao final da gestação, os animais adultos foram sacrificados por meio de abate sanitário no Abatedouro-Escola da Coordenadoria do Campus da USP de Pirassununga.

Os cordeiros que nasceram vivos foram sacrificados por meio de injeção intravenosa de medicamento eutanasiante (T61®, Intervet-Schering Plough), conforme peso ao nascimento e instruções do fabricante (4mL/50kg) (CEUA FMVZ/USP nº2351/2011).

O bioensaio em ovinos foi realizado no VPS da FMVZ-USP de Pirassununga/SP.

3.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVINOS

3.3.1 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*

As amostras de sangue dos ovinos foram coletadas por venopunção jugular. Para obtenção do soro, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2000G por 10 minutos e armazenadas a -20°C. Os soros foram analisados utilizando a RIFI, conforme descrito por Camargo (1974) e Dubey et al. (1988). Foram consideradas positivas para infecção por *T. gondii* as amostras de soros quando apresentaram título maior ou igual a 64. As amostras positivas foram sucessivamente diluídas na razão 2 até o título final, para avaliação da variação de quantidade de anticorpos (cinética humoral).

As análises sorológicas foram realizadas no VPS da FMVZ-USP de São Paulo/SP.

3.3.2 Parâmetros clínicos

Extensa colheita de dados de bioquímica sérica, hemograma e leucograma foi realizada e registrada para análise em conjunto com dados de isolamento e PCR.

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos de vacutainer contendo EDTA e armazenadas refrigeradas até o momento da análise, realizada no mesmo dia. Foi utilizado o equipamento BC 2800Vet (Mindray®) padronizado para leitura na espécie ovina de contagem total de leucócitos (/μL), contagem total de hemácias (/μL), concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (VCM = fL), hemoglobina

corpuscular média (HCM = pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM = g/dL), distribuição de superfície de hemácias (RDW = %) e contagem total de plaquetas (/μL). Com o sangue total também foi realizado esfregaço sanguíneo para contagem diferencial manual de leucócitos após coloração de Rosenfeld e separação de plasma sanguíneo para leitura de proteína total (g/dL) e fibrinogênio (mg/dL) utilizando refratômetro.

Uma alíquota de soro sanguíneo de cada coleta dos animais foi estocada congelada até o momento da análise de bioquímica sérica. Foi utilizado o equipamento BS-120 (Mindray®) para análises de concentração de globulinas (g/dL), uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL), aspartato transaminase (AST = UI/L), gama glutamil transpeptidase (GGT = UI/L), fosfatase alcalina (FA = UI/L), concentração de proteínas totais e albumina (g/dL).

As análises clínicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HOVET da FZEA-USP de Pirassununga/SP.

3.3.3 Observações necroscópicas

Após o abate e sangria, a ovelha foi aberta com facas de magarefe na mesa de necropsia para exposição dos órgãos e visualização de qualquer anormalidade. No caso de fetos e neonatos foi utilizado somente o material cirúrgico. Os órgãos foram separados em tábua de acrílico e manipulados com pinças e tesouras autoclavadas. Foram fotografados ao lado da régua em caso de anormalidades. Com o bisturi foram cortados 2 pedaços com cerca de 1cm³ dos seguintes órgãos: Linfonodos submandibulares, pré-escapulares, poplíteos e mesentéricos; coração; diafragma; fígado; baço; intestino delgado; músculo (semimembranoso ou semitendinoso); placenta e útero (no caso das ovelhas); masseter; cérebro; timo e globo ocular (no caso dos fetos/neonatos). Após a obtenção dessas amostras foram recolhidos e separados o restante de cérebro, coração, masseter, diafragma e músculo de cada animal para isolamento do parasita.

Também foi possível coletar amostras de colostro da glândula mamária das fêmeas e conteúdo estomacal dos cordeiros, que foram armazenados em tubos Falcon de 15 mL.

As análises *post-mortem* foram realizadas no VPS da FMVZ-USP de Pirassununga/SP.

3.3.4 Exames histopatológicos

Partes dos órgãos recolhidos durante a necropsia foram fixados em formol 10% tamponado durante 24 horas, na proporção de 1:10. No dia seguinte, o formol foi retirado e os frascos coletores foram preenchidos com álcool etílico 70%, ficando armazenados em temperatura ambiente até o momento da preparação das peças de parafina. Após a separação das amostras em cassetes individuais, procedeu-se à etapa de inclusão para formação dos blocos, que consiste na impregnação dos tecidos através de imersão em soluções de etanol 80%, etanol 90% e etanol 100%, durante uma hora em cada. Após essa desidratação, foi realizada a diafanização, onde o álcool foi substituído por três diferentes soluções de xilol (I, II e III), ficando os cassetes submersos também por uma hora em cada uma. Finalmente, na impregnação, última etapa, o xilol é substituído por parafina fundida a 60°C em pequenos blocos, que, após solidificação, permanecem congelados até o momento do corte. Cortes de aproximadamente 4µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) (PROPHET et al., 1992). A coloração especial de PAS (Ácido Periódico reativo de Schiff) foi realizada para auxiliar na identificação dos bradizoítos.

Para a realização da imuno-histoquímica (IHQ), método adaptado de Atmaca et al. (2013), cortes de 4µm de espessura, aderidos a lâminas de vidro com adesivo organo-silano (Starfrost®, Knittel Glaeser Co., Braunschweig, Alemanha), foram desparafinados em estufa por 40 minutos a 65°C, seguidos de imersão em xilol 100%, 2 banhos de 15 minutos cada. A hidratação foi realizada em concentrações decrescentes de etanol (etanol absoluto, 95% e 70%), com banhos de 5 minutos e, finalmente, banho em água corrente e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em solução de citrato de sódio pH 6,0, em panela de pressão, por 2 minutos. Após resfriamento por 20 minutos no próprio tampão, as amostras foram lavadas em PBS (pH 7,4) e, em seguida, tratadas para bloqueio de peroxidase endógena, por 30 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, seguindo-se de lavagem das lâminas com solução tampão PBS.

As lâminas foram incubadas com leite desnatado a 5% diluído em água destilada durante 30 minutos a fim de se obter o bloqueio das ligações proteicas inespecíficas. As etapas subsequentes compreenderam em lavagem com solução tampão adicionada de Tween20 a 1%. Os cortes histológicos foram então delimitados com caneta hidrofóbica e

receberam o anticorpo primário policlonal de coelho anti-toxoplasma (ABCAM Plc., Cambridge, MA, EUA), na diluição 1:200, overnight em câmara úmida, à temperatura de 4°C. Após a lavagem com PBS as amostras foram incubadas com anticorpo secundário universal biotilado seguido da estreptavidina, utilizado conforme indicação do fabricante para a amplificação da reação (LSAB 2- System HRP, Code K0690, Dako Cytomation, Inc. – Carpinteria, CA, EUA.).

A revelação da reação foi feita utilizando-se 3',3'-tetraidrocloroto de diaminobenzidina (DAB - Code K3468, Dako Cytomation) por 2 minutos e a subsequente lavagem em água destilada.

A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, seguida pela lavagem em água corrente, passagem em água destilada, desidratação em banhos de alcoóis graduados 70% e 95%, e 3 banhos em álcool absoluto, com 4 mergulhos em cada, diafanização (4 banhos de Xilol) e montagem em resina sintética e lamínula.

As lâminas de controle negativo foram incubadas com o mesmo isotipo de imunoglobulina G de coelho, na mesma concentração, e processadas simultaneamente para confirmar a especificidade dos anticorpos primários e desconsiderar interações inespecíficas.

A avaliação utilizada foi qualitativa, determinando-se a presença ou ausência de *Toxoplasma gondii*. As imagens foram obtidas em microscópio acoplado a um sistema de câmera de vídeo e computador. Todas as lâminas foram escaneadas utilizando objetiva de 100x.

As análises histopatológicas foram realizadas nos Laboratórios de Patologia da FMV da FZEA-USP de Pirassununga/SP.

3.3.5. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em camundongos

Parte dos tecidos recolhidos após o abate das ovelhas e a necropsia dos fetos (cérebro, coração, diafragma, músculo esquelético e masseter) foi mantida refrigerada por no máximo 24 horas para posterior digestão péptica e inoculação em camundongos. O processamento desse material seguiu o protocolo de Dubey (1998).

Os órgãos foram cortados em pequenos pedaços, sendo retirado o tecido conectivo dos tecidos musculares. O cérebro foi utilizado integralmente e o restante dos tecidos foi adicionado até que se completassem 50g no total. O “pool” de tecidos foi homogeneizado com cinco volumes de NaCl 0,15M estéril (salina), sendo usado um homogeneizador de uso doméstico.

Ao material homogeneizado adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1-1,2 (pepsina=2,6g; NaCl=5g; HCl=7mL; H₂O destilada suficiente para 500mL de solução) recém-preparada e aquecida em banho-maria a 37°C. A mistura foi incubada a 37°C por uma hora. Após a incubação, a suspensão foi coada através de duas camadas de gaze e o coado foi transferido para seis tubos cônicos de centrifugação de 50mL. Os tubos foram centrifugados a 1200G por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada tubo foi neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2% (pH~8,3) recém preparado. A neutralização foi verificada visualmente pela mudança de cor do sedimento e checada através do uso de fitas de pH. Após homogeneização, o conteúdo foi transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 50mL com solução salina fisiológica 0,9% autoclavada. A suspensão foi novamente centrifugada a 1200G por 10 minutos a 4°C.

Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado com solução de antibiótico (2000U de penicilina + 200µg de estreptomicina/mL) na proporção 1:1. Com o inóculo pronto, seu uso foi feito imediatamente.

Foram utilizados quatro camundongos suíços albinos fêmeas de cerca de 2 meses de idade para cada ovino, nos quais foram inoculados subcutaneamente 1,0 a 1,2mL da amostra de pool de tecidos digerida. No caso de parição de gêmeos, foi realizada a digestão péptica de pool de órgãos de ambos, com inoculação no mesmo grupo de camundongos. Cada grupo de camundongos correspondente a um animal do estudo (ou dois no caso de gêmeos) era mantido em caixa separada e observado diariamente.

Os camundongos que vieram a óbito após a inoculação tiveram fragmentos de pulmão e cérebro imediatamente examinados por microscopia óptica para pesquisa de estágios de vida de *T. gondii* (taquizoítos ou cistos), conforme Dubey e Beattie (1988). Partes dos tecidos analisados foram armazenadas.

Os camundongos sobreviventes foram sacrificados em câmara de CO₂ dois meses após a inoculação e examinados da mesma forma. Neste caso, foram colhidas e armazenadas amostras de coração e cérebro.

Em todos os casos as amostras de tecidos foram armazenadas em microtubos e estocadas em freezer a -20°C, para diagnóstico molecular. Também foram coletadas amostras de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, através da RIFI.

Os bioensaios em camundongos foram realizados no VPS da FMVZ-USP de Pirassununga/SP.

3.3.6 Identificação molecular de *Toxoplasma gondii*

Assim como todos os órgãos obtidos no isolamento em camundongos, parte dos tecidos recolhidos durante a necropsia dos ovinos foi estocada sob congelamento a -20 °C. Posteriormente, estes tecidos foram testados por PCR (polymerase chain reaction) como descrito por Burg et al. (1989); Ausubel et al. (1999) e Soares et al. (2011) para detecção de DNA (desoxyribonucleic acid) de *T. gondii*. Para extração de DNA foi utilizado kit Qiagen® DNAeasy Blood&Tissues, protocolo *Tissues Spin*. No caso de amostras de sangue foi utilizado o protocolo *Blood Spin* de acordo com as recomendações do kit.

As amostras que resultaram positivas foram submetidas a PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphisms) para identificação do genótipo envolvido na infecção (PCR-RFLP-genotyping). A PCR-RFLP-genotyping é direcionada com 12 marcadores de diferentes *loci* e tem sido uma abordagem amplamente utilizada para identificar as diversas linhagens genotípicas de *T. gondii* existente no mundo (SU et al., 2006; PENA et al., 2008), tendo por objetivo comparar a linhagem encontrada nos tecidos processados com aquela utilizada no início do experimento (diferenciação entre os genótipos BrI e BrIII).

Sucintamente, as sequências de DNA alvo foram primeiramente amplificadas em duas *multiplex* PCR usando os primers externos para todos os marcadores (multiplex 1: SAG1, 5'3'SAG2, SAG3, BTUB e GRA6; multiplex 2: novo SAG2, c22-8, c29-2, PK1, Apico, L358 e CS3) seguido de nested-PCR para os marcadores, individualmente, utilizando os primers internos, e digestão enzimática em placa.

O PCR foi realizado no VPS da FMVZ-USP de Pirassununga/SP e o RFLP no VPS da FMVZ-USP de São Paulo/SP.

3.3.7 Análise Estatística

Para analisar os dados imunológicos entre os grupos foi calculada a área abaixo da curva da média de títulos de anticorpos para cada grupo e os resultados avaliados pelo teste ANOVA duas vias. Os parâmetros clínico-patológicos, hematológicos e bioquímicos foram analisados de forma quantitativa, verificando-se a diferença entre os grupos antes e após a reinfecção, em cada tempo, entre tempos e entre pré e pós reinfecção com o teste ANOVA, post-hoc com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis, post-hoc U de Mann-Whitney, a depender da aderência da distribuição dos valores à distribuição normal, sendo esta verificada com o teste de Kolmogorov Smirnov (SIEGEL, 1981; ZAR, 2013).

Todos esses resultados também foram analisados de forma qualitativa. Comparando-se com valores de referência de normalidade para a espécie ovina, foi realizada uma classificação individual de acordo com sua alteração, variando de zero (normal) a dois (intensamente alterado). Os parâmetros de cada animal foram agrupados de acordo com os aspectos aferidos (hemograma, leucograma, bioquímica sérica e alterações de necropsia) e foram aplicados os mesmos testes descritos previamente. Todas as análises estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram realizadas utilizando-se o software SPSS versão 16 (SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Chicago).

A figura 5 resume os principais procedimentos realizados neste estudo.

Figura 5 - Fluxograma do resumo do projeto

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2011), fundo adaptado de Dubey, 2010.

Legenda: (1) RIFI; (2) PCR; (3) US; (4) Análises clínicas; (5) Análises histopatológicas; (6) Isolamento (camundongos).

4 RESULTADOS

4.1 BIOENSAIO EM GATOS

Foi possível a obtenção de oocistos de cinco gatos inoculados, sendo que esse material foi analisado, testado e armazenado separadamente. Foram obtidas quantidades variadas de oocistos de cada animal, sendo que ao final do bioensaio obtiveram-se cerca de $2,0 \times 10^6$ oocistos de TgCatBr 71 (genótipo BrI) e $1,2 \times 10^7$ oocistos de TgCatBr 60 (genótipo BrIII) no total.

Os resultados das análises dos animais utilizados no bioensaio se encontram descritos no Apêndice A.

4.2 TESTE DE VIABILIDADE DE OOCISTOS

No caso dos dez camundongos inoculados com oocistos do genótipo BrI, nove vieram a óbito entre 9 e 13 dias após a infecção, sendo todos necropsiados e visualizados taquizoítos em pulmão, confirmando a ocorrência de toxoplasmose aguda. Os dez camundongos inoculados com oocistos do genótipo BrIII apresentaram sintomatologia clínica da enfermidade (pêlos arrepiados, dorso arqueado), porém sobreviveram e foram eutanasiados 35 dias após a inoculação, junto com o sobrevivente inoculado com BrI. Em todos eles, exceto o do grupo BrI, puderam ser observados cistos teciduais no cérebro. Portanto, os oocistos foram considerados aptos para serem utilizados como inóculo para as ovelhas.

Foi realizada análise sorológica dos camundongos utilizados, como ilustrado nas figuras 6 e 7:

Figura 6 - Títulos de anticorpos anti-*T. gondii* obtidos através de RIFI em dez camundongos inoculados com isolado patogênico (BrI), ponto de corte=1:16 - Pirassununga - 2012

Figura 7 - Títulos de anticorpos anti-*T. gondii* obtidos através de RIFI em dez camundongos inoculados com isolado não patogênico (BrIII), ponto de corte=1:16 - Pirassununga - 2012

Amostras de tecido (linfonodos mesentéricos e fígado) dos camundongos foram utilizadas como controle positivo para técnica de Imunohistoquímica, conforme figura 8.

Figura 8 - Imunopositividade de antígeno anti-*Toxoplasma gondii* em linfonodo de camundongo, cromógeno DAB e contra-coloração hematoxilina (IHQ) em objetiva de imersão, 100x - Pirassununga - 2015

Fonte: (STREFEZZI, R., 2015).
Legenda: cisto tecidual (seta).

4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVINOS

4.3.1 Primeira infecção

Sete dias após a primo-infecção com *T. gondii*, quase todos os animais apresentaram hipertermia, conforme o quadro 1.

Quadro 1: Temperatura (°C) retal das ovelhas no D₇, normal = 38,5 a 39,5°C - Pirassununga - 2012

GRUPO 1		GRUPO 3	
OVELHA 1	39,4	OVELHA 10	40,9
OVELHA 2	40,9	OVELHA 11	41,5
OVELHA 3	40,8	OVELHA 12	41,7
OVELHA 4	40,7	OVELHA 13	41,3
GRUPO 2		GRUPO 4 (CONTROLE)	
OVELHA 5	41,0	OVELHA 14	38,5
OVELHA 6	39,2	OVELHA 15	38,7
OVELHA 7	40,7	OVELHA 16	39,0
OVELHA 8	40,9	OVELHA 17	38,7
OVELHA 9	41,5	OVELHA 18	38,8

Foi necessário tratamento de suporte através de intervenção com dipirona injetável IM (50mg/kg), ainda assim os animais permanecendo prostrados e apáticos durante 3 dias.

Todos os animais dos grupos 1, 2 e 3 apresentaram título ≥ 64 após o 7º dia da infecção oral (DPI) com oocistos, com picos durante o primeiro mês e declínio cerca de três meses após a primo-infecção, porém mantendo-se soropositivos até o desafio seguinte. Todos os animais do grupo 4 (controle) apresentaram resultado negativo na RIFI (Tabela 1).

Tabela 1 - RIFI para obtenção de títulos de anticorpos após infecção oral em ovinos com diferentes isolados de *T. gondii* na primeira infecção - Pirassununga - 2012

		DIAS APÓS INFECÇÃO									
		7	14	21	28	35	42	56	70	84	126
GRUPO 1	OV 1	N	256	128	512	2048	8192	16384	4096	512	256
	OV 2	N	512	512	2048	1024	2048	4096	1024	512	512
	OV 3	N	512	512	32768	8192	8192	8192	8192	8192	4096
	OV 4	N	512	4096	8192	4096	4096	2048	4096	2048	1024
GRUPO 2	OV 5	N	512	16384	8192	8192	8192	8192	4096	1024	1024
	OV 6	N	2048	512	512	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	OV 7	N	512	2048	4096	4096	4096	1024	8192	4096	1024
	OV 8	N	512	4096	4096	16384	32768	4096	4096	512	128
	OV 9	N	512	512	4096	8192	2048	2048	2048	1024	512
GRUPO 3	OV 10	N	1024	1024	4096	16384	8192	512	4096	512	1024
	OV 11	N	512	4096	4096	2048	8192	1024	2048	1024	1024
	OV 12	N	256	2048	4096	4096	4096	4096	2048	2048	1024
	OV 13	N	2048	2048	2048	16384	16384	2048	1024	8192	1024
GRUPO 4	OV 14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	OV 15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	OV 16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	OV 17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	OV 18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: N = negativo (título<64)

4.3.2 Segunda infecção (desafio)

Não foram observados abortamentos durante o estudo, todas as gestações prosseguiram normalmente, conforme observou-se nas ultrassonografias semanais. Algumas alterações clínicas e laboratoriais, como aumento de linfonodos e de fibrinogênio, foram registrados. As ovelhas 12 e 13 apresentaram um quadro agudo de intoxicação alimentar duas semanas antes da data prevista para parição e vieram à óbito. Considerou-se já ultrapassado o período de ocorrência de abortamentos atribuídos à toxoplasmose, por se encontrarem em fase final de gestação, portanto procedeu-se a necropsia com coleta de amostras da mesma forma que nos outros animais.

Para que fosse possível detectar resposta imune humoral do recém-nascido livre de interferência de anticorpos de origem materna, os cordeiros foram impedidos de mamar o colostro, sendo realizada sua eutanásia o mais rápido possível para evitar grande sofrimento. Dessa forma, não foi possível obter informações sobre mortalidade peri-natal ou avaliar se os cordeiros nascidos eram debilitados ou não. Contudo, nenhum deles apresentava anormalidades congênitas. As 18 ovelhas emprenhadas geraram 24 cordeiros. Somente o cordeiro nascido da Ovelha 10 conseguiu mamar o colostro, porém foi imediatamente separado da mãe e foram seguidos os mesmos procedimentos de eutanásia e coleta de amostras. A análise dos soros obtidos dos cordeiros revelou resultados negativos para todos, com exceção do cordeiro nascido da Ovelha 10, ao qual se atribui presença de anticorpos colostrais maternos circulantes.

As figuras 9, 10 e 11 mostram a cinética da resposta humoral aferida pela RIFI das ovelhas durante todo o estudo, desde a primeira inoculação. A figura 12 mostra a cinética da resposta humoral média nos grupos experimentais, onde a área sob a curva do gráfico foi utilizada para realização da análise estatística. Segundo o ANOVA duas vias, não houve diferença significativa da média de anticorpos comparando-se entre os Grupos 1, 2 e 3 nem na primeira infecção nem na reinfecção. Porém, testando-se a variação de média de títulos de IgG ao longo do experimento dentro de cada grupo isoladamente, observou-se diferença estatística entre a primo-infecção e o desafio no Grupo 1 ($p=0,016$), ou seja, a resposta imune foi significativamente menor em ovelhas desafiadas com oocistos de genótipo BrIII que tinham sido previamente infectadas com *T. gondii* do genótipo BrI.

Figura 9 - Curva de títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos animais do Grupo 1 (primo inoculação BrI, segunda inoculação BrIII) ao longo do experimento - Pirassununga – 2013

Figura 10 - Curva de títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos animais do Grupo 2 (primo inoculação BrIII, segunda inoculação BrI) ao longo do experimento - Pirassununga - 2013

Legenda: A linha vermelha indica o momento da segunda infecção e a linha verde mostra o início da gestação.
 Coordenadas: títulos RIFI. Abscissas: dias decorridos do início do experimento, considerando o dia 0 como o dia em que ocorreu a primo inoculação.

Figura 11 - Curva de títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos animais do Grupo 3 (primo inoculação BrIII, segunda inoculação BrIII) ao longo do experimento - Pirassununga - 2013

Legenda: A linha vermelha indica o momento da segunda infecção e a linha verde mostra o início da gestação.
 Coordenadas: títulos RIFI. Abscissas: dias decorridos do início do experimento, considerando o dia 0 como o dia em que ocorreu a primo inoculação.

Figura 12 - Curvas das médias de títulos de anticorpos dos animais dos Grupos 1, 2 e 3 desde a primo-infecção até 84 dias após a reinfecção - Pirassununga - 2013

Legenda: Coordenadas: títulos RIFI. Abscissas: dias decorridos do início do experimento, considerando D0' a data em que ocorreu a reinfecção.

Na tabela 2 estão descritos os resultados resumidos das análises de patologia clínica realizadas nas ovelhas durante a segunda parte do experimento, desde sete dias após a reinfecção com *T. gondii* e semanalmente até o dia 70, com 22 diferentes parâmetros metabólicos e hematológicos. Nas análises bioquímicas, é possível observar que os valores de proteína total encontram-se no limite mínimo nos Grupos 1, 2, 3 e 4. A razão Albumina:Globulina (A:G), realizada para melhor determinação de quadros de inflamação hepática crônica, está aumentada no Grupo 1, considerando-se o desvio padrão para mais. O valor médio de GGT no Grupo 2 e no Grupo 4 (controle) estão aumentados, porém considerando-se o desvio padrão pode ser notado aumento em todos os grupo. Nos demais tipos não foram observadas alterações.

Nos resultados de hemograma, em todos os grupos o CHCM e o RDW estão próximos ao limite mínimo dos valores indicados pela literatura. Nos grupos 3 e 4 em geral observou-se plaquetopenia leve e, considerando-se o desvio padrão, em todos os grupos ocorre essa alteração. Ao longo do estudo foram observados que alguns animais dos grupos experimentais 1, 2 e 3 apresentaram aumento da quantidade de fibrinogênio plasmático em

níveis acima do normal, indicativo de resposta inflamatória, como se notou pelos valores de desvio padrão, embora as médias tenham permanecido dentro da normalidade.

Nos parâmetros do leucograma, notaram-se discretas linfopenia no Grupo 2 e alteração no número de eosinófilos considerando-se o desvio padrão para mais nos Grupos 3 e 4.

Tabela 2 - Resultados de parâmetros bioquímicos e hematológicos (média±desvio padrão) das ovelhas utilizadas no estudo, obtidos durante a segunda infecção com *T. gondii* - Pirassununga - 2013

PARÂMETRO	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	VALOR DE REFERÊNCIA*
<i>Bioquímica sérica</i>					
Proteína total (g/dL)	5,8±0,3	6,0±0,2	5,8±0,4	5,9±0,4	6,0 – 7,9
Albumina (g/dL)	2,8±0,5	2,8±0,3	2,8±0,2	2,9±0,2	2,8 – 4,0
Relação A:G (g/dL)	1,0±0,9	0,9±0,2	0,9±0,1	1,0±0,1	0,6 – 1,3
Uréia (mg/dL)	23,25±4,26	21,99±5,68	25,07±6,57	23,73±5,13	17,14 – 42,86
Creatinina (mg/dL)	1,3±0,2	1,3±0,1	1,4±0,1	1,3±0,2	1,2 – 1,9
AST (UI/L)	73,7±18,1	85,1±16,6	83,0±12,0	81,5±13,8	78 - 132
GGT (UI/L)	49,2±13,2	63,5±8,0	45,9±8,4	60,2±10,0	20 – 52
<i>Hemograma</i>					
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	10,1±0,9	10,5±1,1	11,1±1,3	11,1±1,0	8 – 15
Hemoglobina (g/dL)	10,4±1,3	11,0±1,6	11,2±1,4	11,6±1,4	8 – 16
Hematócrito (%)	33±3,5	34±4,1	35±3,3	35±3,6	27 – 45
VCM (fL)	32,6±1,0	32,4±1,9	31,9±1,5	31,7±1,1	23 – 48
HCM (pg)	10,2±0,6	10,5±1,0	10,1±0,6	10,4±0,7	8 – 12
CHCM (g/dL)	31,4±1,2	32,4±1,6	31,8±1,7	32,8±1,9	31 – 34
RDW (%)	16,9±0,8	17,0±1,1	17,0±1,1	17,0±1,1	16 – 22
Plaquetas (x10 ³ /μL)	417,1±195,7	338,9±178,9	277,6±144,7	229,3±121,9	300 – 800
Fibrinogênio (mg/dL)	370±178,6	364±168,7	363±204,6	342±147,1	Até 500
<i>Leucograma</i>					
Leucócitos (x10 ³ /μL)	7,0±2,4	6,8±3,0	8,8±2,5	8,8±3,5	4 – 12
Neutrófilos Segmentados (x10 ³ /μL)	3,2±1,8	3,1±1,9	3,6±1,8	4,2±1,9	0,7 – 6,0
Linfócitos (x10 ³ /μL)	3,3±1,3	2,9±1,2	4,3±1,5	3,7±1,7	2,0 – 9,0
Monócitos (x10 ³ /μL)	0,2±0,2	0,2±0,1	0,2±0,2	0,2±0,2	0 – 0,7
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	0,4±0,2	0,5±0,4	0,7±1,1	0,7±0,7	0 – 1,0
Basófilos (x10 ³ /μL)	0,013±0,031	0,006±0,020	0,009±0,027	0,013±0,040	0 – 0,300

Legenda: *MEYER, HARVEY, 2004; KANEKO, HARVEY, BRUSS, 1997; WEISS, WARDROP, 2010.

A esses resultados quantitativos foram aplicados testes estatísticos para verificação de diferença entre cada tempo de avaliação (do dia 7 ao dia 70 da reinfecção), comparando-se os Grupos 1, 2 e 3 com o Grupo 4 (controle) e os grupos experimentais entre si, conforme descritos nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 - Dias após reinfecção em que foram observadas análises clínicas com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos animais dos grupos experimentais em comparação com o Grupo 4 (controle) - São Paulo - 2015

DIAS APÓS O DESAFIO (SEGUNDA INFECÇÃO)								
PARÂMETRO	7	21	28	35	42	49	56	70
Grupo 1	hemácias			$p=0,01^a$				
	hemoglobina		$p=0,055^{*a}$		$p=0,01^a$			
	HCM		$p=0,015^a$					
	CHCM		$p=0,001^a$		$p=0,054^a$			
	plaquetas						$p=0,045^a$	
	neutrófilos	$p=0,029^a$						
	linfócitos							$p=0,054^{*b}$
Grupo 2	CHCM		$p=0,023^a$					
	leucócitos	$p=0,007^a$						
	neutrófilos	$p=0,001^a$						
	eosinófilos	$p=0,050^{*b}$						
	uréia					$p=0,012^b$		
Grupo 3	HCM		$p=0,02^a$					
	CHCM		$p=0,003^a$					
	eosinófilos		$p=0,028^b$					
	creatinina	$p=0,053^{*b}$						

Legenda: *Tendência. ^aDiminuição. ^bAumento.

Tabela 4 - Dias após reinfecção em que foram observadas análises clínicas com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) comparando-se entre infecções com genótipos diferentes (Grupos 1 e 2) - São Paulo - 2015

DIAS APÓS O DESAFIO (SEGUNDA INFECÇÃO)						
PARÂMETRO	7	21	28	42	63	70
HCM				$p=0,003^a$		
CHCM				$p=0,003^a$		
fibrinogênio	$p=0,016^b$					
linfócitos						$p=0,054^{*a}$
AST					$p=0,046^a$	
GGT		$p=0,003^a$	$p=0,016^a$			

Legenda: *Tendência. ^aGrupo 1<Grupo 2. ^bGrupo 1>Grupo 2.

Tabela 5 - Dias após reinfecção em que foram observadas análises clínicas com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) comparando-se infecções de genótipos diferentes (Grupos 1 e 2) com infecções de mesmo genótipo (Grupo 3) - São Paulo - 2015

PARÂMETRO	DIAS APÓS O DESAFIO (SEGUNDA INFECÇÃO)				
	7	21	28	35	42
hemácias	$p=0,017^a$			$p=0,023^a$	
hemoglobina					$p=0,023^a$
CHCM					$p=0,048^a$
leucócitos		$p=0,009^b$			
linfócitos		$p=0,001^b$			
eosinófilos		$p=0,046^c$			
GGT		$p=0,004^d$	$p=0,016^d$		

Legenda: ^aDiminuição em Grupo 1. ^bDiminuição em Grupo 2. ^cAumento em Grupo 3. ^dAumento em Grupo 2.

A média dos valores das aferições de parâmetros clínica também gerou uma classificação robusta de intensidade de infecção para cada animal (Apêndice B) utilizada para análises qualitativas, que permitiram que se comparassem os resultados já obtidos com as análises quantitativas. Como consideraram também as alterações em animais controle, foi possível diminuir o erro gerado por alterações devido à gestação. Observou-se significância ($p < 0,05$) na contagem de plaquetas ($p=0,000004$), no número de neutrófilos ($p=0,002$), na relação A:G ($p=0,012$) e no valor de GGT ($p=0,042$).

4.4 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS EM NECROPSIAS

4.4.1 Grupo 1

Em todas as placentas recuperadas foram observadas pequenas formações lineares amareladas (Figura 13 A e B) identificadas inicialmente como depósitos de fibrina (resposta inflamatória). Em um dos animais, essas formações ocorriam somente ao redor do cordão umbilical (Figura 14). Uma das ovelhas com gestação gemelar apresentou uma alteração em um dos cornos uterinos, onde havia uma região verde escura estriada sem carúnculas (Figura 15). Em outro útero analisado foram observados nódulos esbranquiçados na base das carúnculas (Figura 16).

Figura 13 A e B - Formações lineares amareladas (“fibrina”) em locais difusos em placentas de ovelhas do Grupo 1 (setas) - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013).

Figura 14 - Formações lineares amareladas, identificadas como fibrina sobre o cordão umbilical de ovelha do Grupo 1 (seta) - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013).

Figura 15 - Área de coloração verde escura localizada em corno uterino de ovelha do Grupo 1 (seta) - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013).

Figura 16 - Áreas amareladas na base da carúncula uterina de ovelha do Grupo 1 (seta) - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013)

4.4.2 Grupo 2

Das cinco ovelhas do grupo, quatro apresentavam as mesmas estruturas identificadas como fibrina espalhadas pela placenta, de forma idêntica como foi ilustrado para o Grupo 1.

Uma ovelha apresentava linfonadenomegalia bilateral em linfonodos pré-escapulares. Em cordeiros desse grupo foi observado um animal com hepatomegalia, linfadenomegalia em dois irmãos e esplenomegalia em somente um deles.

Ao se proceder a inspeção do útero da Ovelha 5 do grupo, foi encontrado um feto mumificado (Figura 17) de aproximadamente 30 cm, com pescoço retorcido, membros anteriores e posteriores deformados e sem globos oculares.

Figura 17 - Feto mumificado encontrado no útero de ovelha do Grupo 2 - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013).

4.4.3 Grupo 3

As quatro ovelhas desse grupo também apresentavam as mesmas formações amareladas do tipo fibrina espalhadas pelas placentas, conforme descrito.

Duas ovelhas apresentavam linfadenomegalia generalizada e em uma delas o coração parecia aumentado, porém não foram aferidos seu tamanho ou peso. A terceira ovelha apresentava linfadenomegalia em linfonodos pré escapulares, sendo que no seu cordeiro foi observada hepatomegalia e aumento dos linfonodos poplíteos (Figura 18 A e B). Em outro cordeiro foi observada hepatomegalia.

Figura 18 A e B - Hepatomegalia (A) e linfadenomegalia de linfonodo poplíteo (B) em cordeiro do Grupo 3 (setas) - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013).

4.4.4 Grupo 4

Não foi observada nenhuma alteração nas placentas dos animais desse grupo. Uma das ovelhas apresentava aumento de linfonodos pré-escapulares.

4.4.5 Estatística

As alterações patológicas observadas durante a necropsia foram classificadas qualitativamente e analisadas com os testes estatísticos já referidos. Avaliou-se se existiu diferença entre o total e a média de alterações por grupos, seguido pelo teste individual dos parâmetros por grupo. Todos os grupos diferiram do grupo controle no total e na média, sendo o valor de p de 0,028, 0,012 e 0,003 para os Grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Considerando-se os tecidos alterados, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para placenta ($p = 0,001$) e linfonodos ($p = 0,036$).

4.5 ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS EM NECROPSIA

4.5.1 Histopatologia e imunohistoquímica

Cortes histológicos de cérebro e coração dos cordeiros nascidos das ovelhas dos grupos experimentais e do controle foram submetidos à avaliação pelas três técnicas descritas no item 3.3.4. Da mesma forma, foram analisadas amostras de placentas de animais dos Grupos 1, 2 e 3 e coração da Ovelha 13, observados com alterações durante as necropsias. A tabela 6 mostra os tecidos de cordeiros com resultados positivos no PAS e na IHQ, sendo que nenhuma amostra foi positiva na HE. A figura 19 ilustra exemplo de tecido positivo na técnica de IHQ. Amostras de placentas da Ovelha 3 do Grupo 1, da Ovelha 6 do Grupo 2 e da Ovelha 13 do Grupo 3 foram positivas nos três testes.

As principais observações apontadas na análise das lâminas de HE dos animais positivos foram presença de eosinófilos em linfonodos; hemossiderina, eritropoiese extramedular e infiltrado inflamatório mononuclear perivascular em fígado.

Tabela 6 – Amostras de tecidos de cordeiros dos grupos experimentais positivas na análise histopatológica corada com reativo de Schiff (PAS) e na imunohistoquímica (IHQ) – Pirassununga – 2015

		PAS		IHQ	
		CER	COR	CER	COR
Grupo 1	Cordeiro 1 Ovelha 1			x	
Grupo 2	Cordeiro Ovelha 9	x		x	
Grupo 3	Cordeiro Ovelha 10			x	x

Legenda: CER = cérebro; COR = coração.

Figura 19 – Corte histológico de cérebro da Ovelha 10 do Grupo 3 com cisto tecidual (seta) marcado positivamente para *T. gondii* pela IHQ, aumento de 100x – Pirassununga – 2015

Fonte: (STREFEZZI, R., 2015).

4.6 ISOLAMENTO EM CAMUNDONGOS

Houve mortalidade por toxoplasmose aguda em camundongos desafiados com tecidos provenientes das Ovelhas 2, 3 e 4 do Grupo 1 e da Ovelha 13 do Grupo 3, sendo que em todos esses casos foram visualizados taquizoítos em pulmão. Nenhum dos camundongos dos bioensaios de cordeiros morreu naturalmente.

Em camundongos inoculados com tecidos de três ovelhas do Grupo 2 e em camundongos inoculados com tecidos de uma ovelha do Grupo 3 não foram visualizados cistos cerebrais, não sendo possível comprovar o isolamento, somente a infecção através da sorologia positiva de pelo menos um camundongo de cada conjunto pela RIFI. No restante

dos camundongos oriundos das outras ovelhas destes grupos foi possível comprovar a infecção crônica pelo parasito, como mostram as tabelas 7, 8 e 9.

Na tabela 8 observa-se que em um camundongo proveniente dos cordeiros nascidos da Ovelha 7 do Grupo 2 foram visualizados cistos teciduais cerebrais (Figura 20), evidenciando o isolamento de *T. gondii* e, portanto, a transmissão transplacentária. *Toxoplasma gondii* não foi isolado de nenhum outro cordeiro deste e dos demais grupos.

Figura 20 - Cistos teciduais de *T. gondii* (setas) observados em impressão entre lâminas de cérebro de camundongo inoculado com tecido de cordeiro nascido da Ovelha 7, pertencente ao Grupo 2 - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013).

As Tabelas 7, 8 e 9 também dispõem os resultados das análises sorológicas dos camundongos. No caso dos bioensaios com tecidos das ovelhas, foi observado resultado positivo em todas, sendo sempre soropositivo ao menos um dos camundongos de cada conjunto. Já no caso dos cordeiros, além da soroconversão de camundongos inoculados com tecidos provenientes dos cordeiros nascidos da Ovelha 7, nos quais já haviam sido observados cistos teciduais, também houve positivos no conjunto referente ao cordeiro nascido da Ovelha 5, irmão do feto mumificado.

Ainda, as tabelas 7, 8 e 9 contêm resultados das análises de PCR realizadas nos tecidos dos camundongos do bioensaio, que estão descritos no item a seguir.

Tabela 7 - Resultados do bioensaio em camundongos de ovelhas e cordeiros do Grupo 1 e respectivos resultados de testes diagnósticos.– Pirassununga - 2013

INDICADORES DO BIOENSAIO	OVELHA 1	OVELHA 2	OVELHA 3	OVELHA 4
BIOENSAIO DE OVELHAS				
nº camundongos inoculados	4	4	4	4
nº camundongos com morte aguda	0	2	3	2
nº camundongos com taquizoítos observados em pulmão	0	2	3	2
nº camundongos com cistos observados em cérebro	1	0	0	0
nº camundongos positivos pela RIFI	2	1	3	1
nº camundongos positivos para PCR pulmão	NR	2	3	2
nº camundongos positivos para PCR cérebro	1*	0	0	0
nº camundongos positivos para PCR coração	0	0	0	0
BIOENSAIO DE CORDEIROS				
nº de cordeiros nascidos	2	1	2	1
nº camundongos inoculados	4	4	4	4
nº camundongos com morte aguda	0	0	0	0
nº camundongos com taquizoítos observados em pulmão	0	0	0	0
nº camundongos com cistos observados em cérebro	0	0	0	0
nº camundongos positivos na RIFI	0	0	0	0
nº camundongos positivos para PCR cérebro	0	0	0	0
nº camundongos positivos para PCR coração	0	0	0	0

Legenda: nº = total de animais. NR = não realizado. *Além do cérebro e coração, foi coletado tecido dos globos oculares do camundongo, pois o animal apresentava opacidade de córnea.

Tabela 8 - Resultados do bioensaio em camundongos de ovelhas e cordeiros do Grupo 2 e respectivos resultados de testes diagnósticos – Pirassununga – 2013

INDICADORES DO BIOENSAIO	OVELHA 5	OVELHA 6	OVELHA 7	OVELHA 8	OVELHA 9
BIOENSAIO DE OVELHAS					
nº camundongos inoculados	4	4	4	4	4
nº camundongos com morte aguda	0	0	0	0	0
nº camundongos com taquizoítos observados em pulmão	0	0	0	0	0
nº camundongos com cistos observados em cérebro	4	0	1	0	0
nº camundongos positivos na RIFI	3	2	1	1	1
nº camundongos positivos para PCR cérebro	4	0	1	0	0
nº camundongos positivos para PCR coração	2	0	0	0	0
BIOENSAIO DE CORDEIROS					
nº de cordeiros nascidos	2*	2	2	2	1
nº camundongos inoculados	4	4	4	4	4
nº camundongos com morte aguda	0	0	0	0	0
nº camundongos com taquizoítos observados em pulmão	0	0	0	0	0
nº camundongos com cistos observados em cérebro	0	0	1	0	0
nº camundongos positivos pela RIFI	4	0	3	0	0
nº camundongos positivos para PCR cérebro	0	0	1	0	0
nº camundongos positivos para PCR coração	0	0	0	0	0

Legenda: nº = total de animais. *1 cordeiro + 1 feto mumificado.

Tabela 9 - Resultados do bioensaio em camundongos de ovelhas e cordeiros do Grupo 3 e respectivos resultados de testes diagnósticos – Pirassununga – 2013

INDICADORES DO BIOENSAIO	OVELHA 10	OVELHA 11	OVELHA 12	OVELHA 13
BIOENSAIO DE OVELHAS				
nº camundongos inoculados	4	4	4	4
nº camundongos com morte aguda	0	0	0	1
nº camundongos com taquizoítos observados em pulmão	0	0	0	1
nº camundongos com cistos observados em cérebro	0	2	4	3
nº camundongos positivos na RIFI	2	2	4	4
nº camundongos positivos para PCR pulmão	NR	NR	NR	1
nº camundongos positivos para PCR cérebro	2	2	4	3
nº camundongos positivos para PCR coração	0	0	0	2
BIOENSAIO DE CORDEIROS				
nº de cordeiros nascidos	1	2	1	1
nº camundongos inoculados	4	4	4	4
nº camundongos com morte aguda	0	0	0	0
nº camundongos com taquizoítos observados em pulmão	0	0	0	0
nº camundongos com cistos observados em cérebro	0	0	0	0
nº camundongos positivos na RIFI	0	0	0	0
nº camundongos positivos para PCR cérebro	0	0	0	0
nº camundongos positivos para PCR coração	0	0	0	0

Legenda: nº = total de animais. NR = não realizado.

4.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *TOXOPLASMA GONDII*

Ao final do bioensaio, todos os órgãos coletados dos camundongos (cérebro, coração e pulmão = 256 amostras) foram testados para detecção de DNA de *T. gondii*. Também foi testado material extraído do globo ocular de um camundongo com opacidade de córnea do bioensaio da Ovelha 1 do Grupo 1 (Figura 21).

Figura 21 - Camundongo do bioensaio apresentando opacidade de córnea - Pirassununga - 2013

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2013).

Foram analisadas as seguintes amostras de tecidos de ovelhas e cordeiros:

- Todos os cérebros e corações dos cordeiros que nasceram das ovelhas dos Grupos 1, 2 e 3 (38 amostras);
- Todos os cérebros das ovelhas dos Grupos 1, 2 e 3 (13 amostras);
- Combinado de tecidos viscerais da múmia encontrada na Ovelha 5 do Grupo 2;
- Tecidos de ovelhas e cordeiros dos Grupos 1, 2 e 3 em que se observaram alterações durante as necropsias:
 - Ovelha 1 = útero e placenta
 - Ovelha 2 = placenta
 - Ovelha 3 = útero e placenta
 - Ovelha 4 = placenta
 - Ovelha 5 = útero e placenta
 - Cordeiro da Ovelha 5 = fígado
 - Ovelha 6 = placenta, linfonodo pré-escapular e fígado
 - Cordeiro 1 da Ovelha 7 = baço e linfonodos
 - Cordeiro 2 da Ovelha 7 = coração e linfonodos
 - Ovelha 8 = fígado
 - Ovelha 9 = placenta
 - Ovelha 10 = placenta e linfonodo pré-escapular
 - Cordeiro da Ovelha 10 = fígado e linfonodos
 - Ovelha 11 = placenta

- Cordeiro da Ovelha 11 = fígado
- Ovelha 12 = placenta e linfonodo pré-escapular
- Ovelha 13 = coração, placenta e linfonodo mesentérico
- Alíquotas de sangue total e/ou sangue do cordão umbilical dos cordeiros nascidos das ovelhas dos Grupos 1, 2 e 3 (18 amostras).

Conforme descrito nas tabelas de resultados de bioensaio em camundongos (Tabelas 7, 8 e 9), no Grupo 1 foi possível a detecção de DNA de *T. gondii* de camundongos do bioensaio de todas as ovelhas, porém de nenhum dos camundongos inoculados com tecidos de cordeiros. Isso também foi observado para os animais provenientes do Grupo 3. Já no Grupo 2, DNA de *T. gondii* foi detectado somente nos camundongos provenientes das Ovelhas 5 e 7, assim como no camundongo do bioensaio dos cordeiros nascidos da Ovelha 7.

Todos os cérebros e corações dos cordeiros que nasceram das ovelhas dos Grupos 1, 2 e 3 foram negativos para PCR-ITS1.

Todos os cérebros das ovelhas dos Grupos 1, 2 e 3 foram positivos para a PCR-ITS1.

O combinado de tecidos viscerais da múmia encontrada na Ovelha 5 do Grupo 2 foi negativo pela PCR-ITS1.

Foi detectado DNA de *T. gondii* nos seguintes tecidos de ovelhas e cordeiros em que se observaram alterações na necropsia: coração e linfonodos do Cordeiro 2 da Ovelha 7 do Grupo 2; placenta da Ovelha 11 e coração da Ovelha 13, ambas do Grupo 3.

As amostras analisadas através da PCR-RFLP e os resultados de genotipagem obtidos estão descritos na tabela 10. A figura 22 mostra o resultado observado com um dos marcadores utilizados no estudo.

Tabela 10 - Resultado final da genotipagem de isolados de *T. gondii* obtidos de camundongos de bioensaio e tecidos primários de ovinos positivos para PCR-ITS1 - São Paulo - 2014

	DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	Nº AMOSTRAS	GENÓTIPO
GRUPO 1	Cérebro camundongo do bioensaio Ovelha 1	1	BrIII
	Globo ocular camundongo bioensaio Ovelha 1	1	BrIII
	Pulmão camundongo do bioensaio Ovelha 2	2	BrI
	Pulmão camundongo do bioensaio Ovelha 3	3	BrI
	Pulmão camundongo do bioensaio Ovelha 4	2	BrI
GRUPO 2	Cérebro camundongo do bioensaio Ovelha 5	4	BrIII
	Cérebro camundongo do bioensaio Ovelha 7	1	BrIII
	Cérebro camundongo do bioensaio Cordeiro da Ovelha 7	1	BrIII
	Coração Cordeiro da Ovelha 7	1	BrIII
	Linfonodos Cordeiro Ovelha 7	1	BrIII
	Cérebro da Ovelha 8	1	NEGATIVO
GRUPO 3	Cérebro de camundongo do bioensaio da Ovelha 10	2	BrIII
	Cérebro de camundongo do bioensaio da Ovelha 11	2	BrIII
	Placenta da Ovelha 11	1	BrIII
	Cérebro de camundongo do bioensaio da Ovelha 12	4	BrIII
	Pulmão de camundongo do bioensaio da Ovelha 13	1	BrIII
	Coração da Ovelha 13	1	BrIII

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose da reação enzimática específica do marcador PK1 para identificação de genótipos de *T. gondii*. - São Paulo - 2014

Fonte: (CHIEBAO, D. P., 2014).

Legenda: Os números se referem a algumas amostras provenientes do bioensaio em camundongos e tecidos primários de ovinos e as letras aos controles positivos específicos de cada genótipo conhecido e controles negativos. I = genótipo BrI. III = genótipo BrIII. neg = negativo.

5 DISCUSSÃO

Pelos estudos disponíveis de genotipagem de *T. gondii* no Brasil, infere-se que BrI e BrIII são os que ocorrem com mais frequência, seguido por BrII e BrIV, também havendo relatos das linhagens clonais tipo III e, mais raro, tipo I (DUBEY et al., 2008, 2012), porém pouco se sabe da influência desses diferentes genótipos atípicos na sintomatologia clínica da enfermidade nas diferentes espécies animais após infecção oral com oocistos. Neste trabalho, através do teste de viabilidade utilizando um inóculo padronizado, foi possível observar que em camundongos albinos suíços o isolado de genótipo BrI utilizado sob a forma de oocistos é patogênico como já relatado (PENA et al., 2008), acarretando 90% de mortalidade nos camundongos inoculados, que pode até ser considerada de 100%, pois o camundongo que não veio a óbito no teste de viabilidade não apresentou sinais da enfermidade, parasitas teciduais ou soroconversão, o que se atribui a provável falha na inoculação. Porém, o isolado de BrIII causa enfermidade visível nos animais e apresenta uma enorme capacidade cistogênica, não sendo considerado patogênico na dosagem de oocistos utilizada por não ter havido mortalidade. Essas informações são importantes tanto na determinação das diferenças biológicas entre genótipos e entre isolados quanto para estudos epidemiológicos, pois o sucesso da disseminação do parasita também depende de sua instalação nos hospedeiros intermediários.

Não há relatos prévios da utilização desses isolados para infecção oral experimental de ovinos, porém a primo-infecção das ovelhas do estudo apresentou resultados compatíveis com descrições de literatura (INNES et al., 2009; DUBEY, 2010), principalmente a ocorrência de hipertermia no terceiro dia, soroconversão com altos títulos de IgG após 7 dias da inoculação e início da queda dos títulos a partir de 2-3 meses pós infecção, podendo, assim, ambos tipos do parasita serem considerados como agentes causativos da enfermidade e geradores de risco clínico significativo para animais prenhes que sejam naturalmente infectados. Não houve diferença estatística entre as médias dos títulos de anticorpos IgG dos grupos experimentais nesta fase, mostrando que nesse aspecto não há diferença da resposta imune humoral em animais suscetíveis, ela é independente do genótipo utilizado no caso dos isolados em questão. A ocorrência de reinfecção nas ovelhas também foi observada após a segunda inoculação, através da alteração de títulos de

anticorpos IgG, que voltaram a aumentar, porém de forma mais gradual e flutuante, chegando a títulos mais altos cerca de 10 dias após a segunda inoculação de oocistos nos Grupos 2 e 3, e somente 28 dias no Grupo 1. Mesmo assim, enquanto o experimento durou, os títulos de anticorpos não caíram em nenhum momento para valores abaixo do ponto de corte de 64 estabelecido para esta espécie de hospedeiro.

Quando os testes estatísticos foram utilizados para comparar médias de títulos de anticorpos na primo-infecção e na reinfecção das ovelhas, foi observado que para o Grupo 1 (primo infectado com genótipo Brl e desafiado com genótipo BrIII) a resposta imune humoral foi menor na reinfecção, com diferença significativa na quantidade de IgG detectada pela RIFI. Isso leva a crer que a primo-infecção por Brl induz uma cinética humoral normal, já que é similar às curvas dos outros grupos, porém a resposta à uma infecção secundária parece não ser tão eficiente quanto a das ovelhas dos outros grupos. De acordo com Wastling et al. (1995), seria esperado que em uma reinfecção subsequente à uma infecção primária, o título de anticorpos em ovinos aumentasse mais rapidamente (“boosting”), como foi observado nos Grupos 2 e 3, onde 7 dias após a reinfecção (D_7') a quantidade média de IgG anti-*T. gondii* produzido pelos animais era maior do que 7 dias após a primo-infecção (D_7). Em ovinos, uma resposta inflamatória inata eficiente do tipo Th1 parece ser importante para inibição da multiplicação de taquizoítos, com consequente desenvolvimento de imunidade adquirida e recuperação de uma infecção primária, da mesma forma protegendo contra uma infecção secundária através da produção de anticorpos específicos 10-12 dias após um desafio (INNES; VERMEULEN, 2006). Estudos realizados para testes de vacinas contra *T. gondii* mostram que ovinos experimentalmente infectados mantiveram uma resposta imune eficiente por até 18 meses após a vacinação (BUXTON, 1993; BUXTON; INNES, 1995), sugerindo que imunizações conferem uma imunidade adquirida eficiente para prevenir a transmissão congênita em desafios durante a prenhez (MCCOLGAN et al., 1988; PFAFF et al., 2007). Porém, Franco et al. (2011) mostram que em roedores, a proteção completa contra toxoplasmose congênita somente ocorre quando são utilizadas cepas de mesmo genótipo para infecção e reinfecção. Os dados aqui apresentados corroboram essas informações, porém também sugerem que, dependendo do genótipo em que se estabelece a primo-infecção, essa proteção pode ser mais eficiente em um desafio posterior. No caso deste estudo, quando se utilizou isolado tipo Brl, patogênico para camundongos, a resposta imune no desafio foi significativamente menor e isso pode se dever ao fato de que

taquizoítos de cepas virulentas apresentarem uma maior capacidade de invasão e multiplicação (DUBEY, 2010), podendo se instalar em locais de difícil acesso para as ferramentas do sistema imune (SNC, globo ocular) antes do desenvolvimento de uma resposta imunológica adquirida adequada. Muito embora não tenha sido detectada repetição da hipertermia em nenhum momento após a re-inoculação, situação que indicaria que a infecção prévia não teria estimulado um efeito protetivo contra a segunda infecção, os animais do Grupo 1, em especial a Ovelha 1, podem ter apresentado flutuações mais discretas na temperatura corporal, que exigiriam maior número de aferições ao longo do dia para serem observadas.

Ao se observar a cinética humoral média dos três grupos, mesmo não havendo diferença estatística em todos, nota-se que a resposta imune na primo-infecção sempre é mais intensa que na reinfecção, ao contrário do que já descrito (WASTLING et al., 1995), provavelmente pelos animais se encontrarem prenhes e naturalmente imunossuprimidos.

Considerando-se uma avaliação fisiológica mais aprofundada da patologia clínica de cada animal, em todos os grupos experimentais puderam ser observadas alterações decorrentes do quadro experimental geral. Os valores de referência utilizados para comparação foram extraídos de publicações amplamente disseminadas na prática veterinária, porém mesmo entre essas publicações e outras menos citadas, incluindo aquelas provenientes da prática no campo, existem variações nesses valores, o que leva a tomadas de decisão no momento de determinar se um determinado parâmetro está alterado ou não. As análises estatísticas foram realizadas baseando-se em valores clássicos de referência internacional (KANEKO et al., 1997; MEYER; HARVEY, 2004; WEISS; WARDROP, 2010), mas para a discussão dos resultados seria mais adequado basear-se em publicações que levassem em consideração fatores como raça dos animais, fatores climáticos e de manejo intrínsecos da ovinocultura brasileira, pouco disponíveis atualmente.

Os valores de proteína diminuídos na média de todos os grupos, incluindo controle, podem estar relacionados com infecção parasitária gastrointestinal crônica (PUGH, 2005). A carga parasitária de todas as ovelhas era avaliada mensalmente e a coloração de mucosas semanalmente, sendo que alguns animais tiveram que receber tratamento em algumas ocasiões. Mas esse controle não eliminou a população de helmintos, sendo constantemente observados valores baixos de OPG e a verminose pode ter reflexo nesses parâmetros, pela diminuição de nutrientes disponíveis para o metabolismo proteico (BORBUREMA et al.,

2012). Outro fator relacionado é a condição reprodutiva, pois o estado de prenhez é uma variável relacionada com alteração da concentração de proteína total, globulinas e creatinina (YOKUS et al., 2006).

Santana et al. (2009) relataram intervalo médio de valores de GGT em ovinos enviados ao abatedouro no Estado de São Paulo similar aos resultados obtidos neste estudo e sendo considerados normais. Em animais obesos e propensos à toxemia da prenhez pode ocorrer aumento de GGT, porém não foi realizada aferição de corpos cetônicos para comprovar o diagnóstico diferencial, pois nenhum animal demonstrou sintomatologia clínica compatível com essa enfermidade (PUGH, 2005; BORGES et al., 2009). A análise estatística qualitativa, onde foram atribuídos escores conforme a variação dos resultados fora do intervalo de referência mostra que os valores de GGT apresentam diferença significativa inclusive no grupo controle, portanto provavelmente não estando relacionado com a infecção experimental. O mesmo ocorre para a relação albumina: globulina, número de neutrófilos e contagem de plaquetas, parâmetros que devem estar ligados a características em comum de todos os animais. Linfadenite caseosa foi uma enfermidade detectada nos animais de todos os grupos durante o experimento, sendo reportada como endêmica no rebanho de procedência das ovelhas. Animais afetados recebiam tratamento sintomático para prevenir continuidade da disseminação, porém ao longo de todo o experimento foram observadas ovelhas acometidas. A infecção é causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bactéria Gram positiva que produz o fator de virulência exotoxina (fosfolipase D), hidrolisante da esfingomielina, um componente importante da membrana citoplasmática. Essa exotoxina atua sobre o endotélio vascular, aumentando a permeabilidade e contribuindo para a disseminação do patógeno do local da infecção primária para os linfonodos, determinando necrose dérmica, agregação plaquetária e, em casos graves, falência renal (BAIRD; FONTAINE, 2007). A enfermidade não era visceral, tendo sido detectada somente em linfonodos superficiais, inclusive durante as necropsias, e após o diagnóstico diferencial os linfonodos acometidos não foram incluídos no cômputo das alterações clínicas. Entretanto, uma das causas da trombocitopenia é o aumento do consumo de plaquetas por vasculite ou outros tipos de lesão vascular, que pode ser consequência da linfadenite caseosa crônica. Não pode ser descartada a hipótese de pseudotrombocitopenia, que é um artefato de técnica. Presença de fibrina no sangue coletado e tempo entre venopunção e processamento maior que duas horas são fatores que

ocorreram durante a coleta de amostras neste estudo e acarretam pseudotrombocitopenia (MEYER; HARVEY, 2004).

Considerando-se os parâmetros que apresentaram diferença significativa quando os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle, foi possível observar maior ocorrência de alteração nas médias entre os dias 21 e 28 após a reinfecção. A diminuição do CHCM em todos os grupos nesse período parece ser a mais importante. As anemias hipocrômicas em ruminantes normalmente estão relacionadas com deficiência de ferro crônicas (HARVEY, 2012). Parâmetros laboratoriais associados com essa deficiência também estão presentes na condição denominada “anemia da doença crônica” ou “anemia da inflamação”, reconhecida em animais com doença infecciosa ou inflamatória, onde frequentemente ocorre o desenvolvimento de anemia. Uma razão evolucionária proposta para esse quadro é de que a anemia seria o resultado de uma adaptação imunológica para limitar o acesso microbiano ao ferro (WEISS; WARDROP, 2010). Assim, a infecção pelo *T. gondii*, independente do genótipo, pode levar a uma resposta metabólica significativa para seu hospedeiro. A pancitopenia, uma diminuição geral dos componentes sanguíneos, pode estar associada com esplenomegalia, pelo aumento da fagocitose das células sanguíneas (HARVEY, 2012) e já foi relacionada com leishmaniose visceral (MARCOS et al., 2009). Interessante notar que o período de maior intensidade de alterações é o mesmo período em que se esperava observar a ocorrência de abortamentos nos animais. Mesmo as infecções não tendo culminado na produção de abortos, é nítido que o organismo dos animais foi impactado. Os animais do Grupo 1 foram os que mais apresentaram alterações, sendo elas significantes ou com tendência à diferença estatística.

Quando se comparou somente os Grupos 1 e 2, onde foram realizados desafios diferentes entre a primo e a reinfecção, o Grupo 1 também apareceu com pior desempenho nos parâmetros hematológicos. Os valores de fibrinogênio foram significativamente mais altos já no dia 7 após a reinfecção, demonstrando uma resposta inflamatória mais aguda, enquanto que HCM e CHCM foram menores que os do Grupo 2. Entretanto, ao longo da reinfecção, o perfil hepático dos animais do Grupo 2 demonstrou ser mais afetado, estando as médias de GGT e AST significativamente maiores. Mesmo que os valores de enzimas hepáticas não estejam fora do intervalo normal, ao se comparar com o controle, essa diferença dentro dos grupos demonstra que há uma sinalização maior proveniente dos fígados dos animais do Grupo 2.

Os efeitos deletérios da reinfecção por diferentes genótipos se tornam evidentes na comparação dos parâmetros dos Grupos 1 e 2 com o Grupo 3. Com exceção da contagem de eosinófilos, em todos os outros em que foi observada significância, ela foi devida a aumento ou diminuição dos valores médios dos animais dos Grupos 1 e 2. Ou seja, os resultados clínico-patológicos dos animais do Grupo 3, onde foi realizada reinfecção pelo mesmo genótipo, se mantiveram mais constantes e dentro da normalidade.

Conforme a descrição de Dubey (2010) sobre a toxoplasmose em ovinos, as alterações em placentas e linfonodos dos animais dos grupos experimentais estão relacionadas com a reinfecção pelo parasita, independente do genótipo de primo-infecção e desafio. Pelo desenho experimental determinado neste estudo, não foi realizado acompanhamento pós-natal dos cordeiros para avaliar seu status sanitário e sobrevida, não sendo possível inferir se as alterações previamente descritas poderiam causar algum impacto em suas condições. Porém, com estes resultados, é possível afirmar que a primo-infecção possibilitou que as ovelhas apresentassem resposta imune na reinfecção. Essa resposta imunológica adquirida pode não ser eficiente o suficiente para evitar efeitos deletérios para o organismo materno, fato caracterizado pelas alterações descritas, observadas principalmente nos animais do Grupo 1, porém conferiram proteção para a progênie durante a reinfecção com os genótipos estudados, prevenindo a transmissão transplacentária exógena.

T. gondii detectado em tecidos de cordeiros através das análises histopatológicas muito provavelmente se deve à transmissão transplacentária endógena, pois na idade gestacional da reinfecção já ocorre produção de imunoglobulinas fetais que tem aumento de concentração plasmática conforme a idade do feto em animais antigenicamente estimulados (SAWYER et al., 1978). Assim sendo, se houvesse transmissão exógena, seriam observados fetos soropositivos ao nascimento, com altos títulos de IgG anti-*T. gondii*, o que não se comprovou com a RIFI.

A presença de *T. gondii* nas placentas, identificadas pela coloração de PAS e IHQ demonstra ação ativa do parasita, atraído por tecido celular em multiplicação. Porém, mesmo com o mecanismo gestacional anti-inflamatório para manutenção do feto, a resposta imunológica anti-parasitária materna parece ter sido eficiente para impedir a transmissão congênita exógena em todos os animais e controlar a endógena na maioria deles, sendo, provavelmente, um resultado da combinação bem-sucedida das respostas

imunes inatas e adaptadas moduladas após o estímulo da primo-infecção, como já observado *in vitro* (CASTRO et al., 2013). A utilização da IHQ em tecidos de cordeiro se mostrou mais eficiente na determinação dos animais positivos, porém o coração não foi considerado um local adequado para inspeção, por apresentar muitas alterações não específicas. A presença de infiltrado inflamatório em lesões teciduais associadas ao parasita já foi relatada (KATZER et al., 2014) e a eritropoiese extramedular ocorre pelos animais serem neonatos (CARLTON; MCGAVIN, 1998).

Não foi possível comprovar transmissão transplacentária exógena durante a reinfecção em nenhum dos grupos, e a transmissão transplacentária endógena total foi de 26% (5/19): 31% (4/13) quando se procedeu a primo-infecção com genótipo BrIII e de 17% (1/6) quando se utilizou o genótipo BrI. Isso considerando-se as marcações teciduais para *T. gondii* na IHQ e que nos tecidos dos dois cordeiros nascidos da Ovelha 7 tenha havido o mesmo tipo de infecção, de acordo com o bioensaio em camundongos, pois a análise molecular em tecidos primários só pôde ser realizada em um deles. Na progênie referente à Ovelha 5 do Grupo 2 há indícios de transmissão devido à soroconversão dos camundongos do bioensaio infectados com tecidos do cordeiro nascido vivo e da presença do feto mumificado, porém não se concluiu o genótipo responsável. Esses resultados corroboram as pesquisas escocesas (BUXTON et al., 2001; RODGER et al., 2006; INNES et al., 2009), que relatam ocorrência de resposta imune celular protetora na maioria dos ovinos cronicamente infectados. Foi observado um nível de transmissão congênita menor ao apontado por Williams et al. (2005), assim como em outros relatos desse grupo (MORLEY et al., 2008; HIDE et al., 2009) e, diferente desses trabalhos, nenhum abortamento ou deformidade neonatal ocorreu nos animais deste experimento. Sendo essas duas características as principais relacionadas com os prejuízos econômicos decorrentes da enfermidade em rebanhos, sugere-se que a transmissão congênita em animais cronicamente infectados não representa impacto maior que o já estabelecido anteriormente no desempenho reprodutivo dos rebanhos ovinos. Essa transmissão congênita endógena pode ter ocorrido pela diminuição de produção de interferon gama, o que é natural no início da gestação, porém a produção dessa citocina também é considerado um dos fatores de estresse para conversão de taquizoítos em bradizoítos (MILLER et al., 2009). Com essa modulação da imunidade adquirida, pode ter havido reativação da infecção primária antes mesmo da reinfecção experimental, porém sem estímulo anti-inflamatório suficiente para alterar o equilíbrio

materno-fetal. A ocorrência da transmissão nos períodos iniciais da gestação (antes dos 60 dias) também explicaria a falta de anticorpos fetais.

Considerando-se todas as análises em conjunto, foi possível aferir que o *T. gondii* não foi encontrado com alta frequência em tecidos fetais. Um dos cordeiros oriundos do Grupo 2 foi o único caso em que se verificou presença de *T. gondii* em todos os testes, confirmando a transmissão placentária. Neste caso, a cepa encontrada foi do mesmo genótipo com o qual a ovelha foi infectada pela primeira vez, indicando que a transmissão foi decorrente de reativação da primo-infecção. A toxoplasmose causando problemas reprodutivos em ovinos pode ser decorrente de dois eventos: re-infecção ou reativação de infecção latente. Pelos resultados deste experimento, a primeira forma parece ter ocorrência pouco significativa e a segunda parece ocorrer com mais frequência, mas sem maiores consequências clínicas para o feto. Os cordeiros da Ovelha 1 do Grupo 1, da Ovelha 9 do Grupo 2 e Ovelha 10 do Grupo 3 tiveram a infecção demonstrada pela IHQ, mas que não foi detectada pelo isolamento em camundongos, técnica já relatada apresentando menor sensibilidade em ovinos (RAGOZO et al., 2008).

Também é digno de nota observar que em apenas um caso, da Ovelha 1 do Grupo 1, os camundongos oriundos do bioensaio realizado com as ovelhas revelaram um genótipo diferente daquele empregado na primeira infecção, onde encontrou-se o genótipo BrIII, indicando então, que essa ovelha foi de fato infectada durante a segunda inoculação. Não foi possível aferir se esta reinfecção alcançou o feto, mesmo tendo sido observada marcação de parasitas em cérebro do cordeiro pela IHQ, já que essa técnica não diferencia o genótipo. Provavelmente havia uma carga parasitária muito baixa nos tecidos destes animais, dificultando o isolamento e caracterização genética.

Genótipos mistos não foram encontrados, então é bastante plausível assumir que o genótipo da primeira infecção tende a prevalecer no indivíduo, impedindo o estabelecimento de outro genótipo de infecções subsequentes em ovinos.

O hospedeiro, o genótipo do parasita e a forma de infecção influenciam drasticamente na evolução da toxoplasmose. Dessa forma, uma mudança de qualquer aspecto no cenário desse tipo de experimento pode trazer resultados bastante diferentes. Em um recente estudo de toxoplasmose congênita em *Calomys* gestantes cronicamente infectadas e reinfectadas com *T. gondii* de genótipos BrI e BrII (FRANCO et al., 2015), foi observado que a resposta imune adquirida na primo-infecção não é suficiente para prevenir

a transmissão vertical. Porém, utilizaram-se oocistos de uma cepa laboratorial do parasito ainda não isolado no Brasil (tipo II clássico) e a reinfecção se procedeu com taquizoítos inoculados intraperitonealmente. Ficou demonstrada a maior patogenicidade das cepas atípicas, principalmente na reinfecção pelo parasita do genótipo BrI, ao se constatar alta taxa de reabsorção fetal e carga parasitária nos animais reinfetados, ao contrário dos resultados aqui descritos. Ainda assim, algumas similaridades foram observadas, como a promoção da transmissão congênita endógena após reinfecção pelo genótipo BrI. De qualquer forma, é preciso cautela ao extrapolar esse resultado para espécies animais com tipos de placenta diferentes, epiteliocorial no caso dos ruminantes e hemocorial no caso de humanos e roedores (SENGER, 2003) e que estejam sendo naturalmente infectados via oral. Neste experimento todas as infecções foram realizadas com oocistos, assumindo-se que esta seja a forma infectante naturalmente ocorrente na cadeia epidemiológica da toxoplasmose ovina. Por exemplo, em suínos vacinados com subunidades de *T. gondii* foi relatado que a imunidade local intestinal pode ser suficiente para limitar a infecção pelo parasita (CUNHA et al., 2012).

Na rede filogenética de *T. gondii*, o genótipo BrIII está próximo ao tipo III clássico, ao qual pertence a cepa utilizada na vacina comercial contra toxoplasmose em ovinos (BUXTON, 1993). Mesmo com o pequeno número de animais utilizado neste experimento, levanta-se a hipótese de que a primo-infecção com o genótipo BrIII pode ser mais eficaz na proteção cruzada, pelo menos contra reinfecção pelo genótipo BrI, já que pelos resultados do bioensaio em camundongos, somente no Grupo 1 foi observada infecção tecidual correspondente ao genótipo utilizado no desafio. Faz-se necessária a realização deste tipo de estudo com outros genótipos prevalentes no Brasil, principalmente BrII.

Não foi objetivo deste trabalho a verificação dos diferentes efeitos patogênicos dos genótipos BrI e BrIII além daqueles decorrentes da transmissão congênita em ovinos, porém devido à importância atual das pesquisas em torno da toxoplasmose ocular em humanos, não se pode deixar de mencionar que foi notada maior ocorrência de alterações oculares após infecção experimental de camundongos com parasitos pertencentes ao genótipo BrIII. Esse fato pode ser decorrente da maior sobrevivência desses animais após infecção, comparando-se com BrI, mas seria interesse a realização de pesquisas abordando esse aspecto, já que a resposta imune obtida em camundongos é tida como ponto de partida para desenvolvimento de estudos em humanos.

Com estes resultados é possível fornecer informações mais precisas sobre o controle da toxoplasmose para ovinocultores. Sugere-se que não há necessidade de abate sanitário de fêmeas soropositivas para *T. gondii*, somente sua identificação no rebanho. Para evitar que a carne de ovinos provenientes de matrizes soropositivas seja uma potencial rota de transmissão ao ser consumida crua ou mal-cozida, esses animais devem ser separados no abatedouro para que a carcaça seja submetida a métodos de descontaminação (OPSTEEGH et al., 2015). O congelamento a -12°C por 2 a 3 dias (dependendo da espessura do corte) inviabiliza os cistos e é o método que traz menos complicações logísticas sem aumentar significativamente os custos de produção (DUBEY, 1988; KIJLSTRA; JONGERT, 2008). A triagem de animais soropositivos deve ser responsabilidade do produtor, salientando-se que o custo das análises sorológicas em massa será comparável ao gasto com uma vacinação preventiva, na eventual futura disponibilidade desta opção.

6 CONCLUSÕES

- Não foi possível comprovar a ocorrência de transmissão congênita exógena na reinfecção com mesmo genótipo ou genótipo distintos do parasita;
- Foi observada taxa de transmissão congênita endógena de 26% em ovelhas cronicamente infectadas com *T. gondii*;
- A primo-infecção provavelmente proporcionou imunidade cruzada contra reinfecção subsequente na maioria dos animais;
- Foi possível a ocorrência de reinfecção em ovelhas quando houve primo-infecção por parasitos do genótipo BrI e desafio pelo genótipo BrIII;
- A reinfecção de fêmeas ovinas por *T. gondii* na fase intermediária da gestação, principalmente por genótipo diferente da primo-infecção, não acarretou abortamento, porém desencadeou alterações fisiológicas deletérias significativas;
- Ovelhas com toxoplasmose crônica podem ser mantidas em reprodução no rebanho, porém medidas sanitárias preventivas devem ser observadas com maior rigor em sua prole.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: OPS, 2003. v. 3, p. 88-98.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1185-1196, 2004.

AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 5, p. 684-689, 2002.

ATMACA, H. T.; GAZYAGCI, A. N.; CANPOLAT, S.; KUL, O. Hepatic stellate cells increase in *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Parasite and vectors**, v. 6, n. 135, p. 1-6, 2013. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/135>. Acesso em: 23 set. 2014

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 4. ed. New York: Wiley, 1999. 1104 p. BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 179-210, 2007.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different diseases? **Current Opinion on Microbiology**, v. 5, p. 438-442, 2002.

BORBUREMA, J. B.; CEZAR, M. F.; MARQUES, D. D.; CUNHA, M. G. G.; PEREIRA FILHO, J. M.; SOUSA, W. H.; FURTADO, D. A.; COSTA, R. G. Efeito do regime alimentar sobre o perfil metabólico de ovinos Santa Inês em confinamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 983-990, 2012.

BORGES, J. R. J.; GODOY, R. F.; XIMENES, F. B.; CASTRO, M. B.; MUSTAFA, V.; RECKZIEGEL, G.; NOVAIS, E. B. F. Doenças hepáticas em ovinos e caprinos. Anais VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte. **Ciência Animal Brasileira**, 2009. Suplemento, 1. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7699/5462>>. Acesso em: 05 fev. 2015.

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1787-1792, 1989.

BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 509-511, 1990.

BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitology Today**, v. 9, p. 335-337, 1993.

BUXTON, D.; INNES, E. A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 110, p. 11-16, 1995. Supplement, 1.

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

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

BUXTON, D.; WRIGHT, S.; MALEY, S. W.; RAE, A. G.; LUNDÉN, A.; INNES, E. A. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 85-91, 2001.

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

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 672 p.

CARME, B.; BISSUEL, F.; AJZENBERG, D.; BOUYNE, R.; AZNAR, C.; DEMAR, M.; BICHAT, S.; LOUVEL, D.; BOURBIGOT, A. M.; PENEAU, C.; NERON, P.; DARDÉ, M. L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adults patients in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4037-4044, 2002.

CARME, B.; DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 1-3, 2009.

CASTRO, A. S.; ALVES, C. M. O. S.; ANGELONI, M. B.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; SILVA, D. A. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; FERRO, E. A. V. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, p. 240-247, 2013.

COSENDEY-KEZENLEITE, R. I. J.; OLIVEIRA, F. C. R.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; DUBEY, J. P.; SOUZA, G. N.; FERREIRA, A. M. R.; LILENBAUM, W. Occurrence and risk factors associated to *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, p. 1463-1466, 2014.

CUNHA, I. A. L.; ZULPO, D. L.; BOGADO, A. L. G.; DE BARROS, L. D.; TARODA, A.; IGARASHI, M.; NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 216-221, 2012.

DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, p. 366-71, 2008.

DEMAR, M. AJZENBERG, D.; MAUBON, D.; DJOSSOU, F.; PANCHOE, D.; PUNWASI, W.; VALERY, N.; PENEAU, C.; DAIGRE, Z. L.; AZNAR, C.; COTRELLE, B.; TERZAN, L.; DARDÉ, M. L.; CARME, B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along Maroni River: epidemiological, clinical and parasitological aspects. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 88-95, 2007.

DELHAES, L.; AJZENBERG, D.; SICOT, B.; BOURGEOT, P.; DARDÉ, M. L.; DEI-CAS, E.; HOUFFLIN-DEBARGE, V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. **Prenatal Diagnosis**, v. 30, p. 902-905, 2010.

DESMONTS, G.; NAOT, Y.; REMINGTON, J. S. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infection diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, p. 486-491, 1981.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 877-882, 2009a.

DUBEY, J. P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effects of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 910-913, 1988.

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

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 338 p.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis and cyclosporiasis. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, E. J. L.; SIMPSON, D. J. H. (Ed.). **Zoonoses**. Oxford: University Press, 1998. p. 579-597.

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

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

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 4, p. 537-46, 1976.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. Enzootic toxoplasmosis in sheep in north-central United States. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 673-676, 1989.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375-1424, 2012.

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 Review**, v. 11, p. 267-99, 1998.

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Parasitaemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 111-114, 1980.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. J.; DE OLIVEIRA, L. N.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. M.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 299-305, 2008.

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

EKMAN, C. C. J.; CHIOSSI, M. F. V.; MEIRELES, L. R.; ANDRADE JÚNIOR, H. F.; FIGUEIREDO, W. M.; MARCIANO, M. A. M.; LUNA, E. J. A. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in a industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 54, n. 5, p. 239-244, 2012.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 2, p. 280-285, 2009.

FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 3-4, p. 161-166, 2004.

FIRETTI, R.; OLIVEIRA, E. C.; OLIVEIRA, D. E. S. Características e preferências do consumo de carne ovina em cidades do interior do Estado de São Paulo. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 1-8, 2014.

FLEISCH, A.; WERNE, S.; HECKENDORN, F.; HARTNACK, S.; PIECHOTTA, M.; BOLLWEIN, H.; THUN, R.; JANETT, F. Comparison of 6-day progestagen treatment with Chronogest® CR and Eazi-breed™ CIDR® G intravaginal inserts for estrus synchronization in cyclic ewes. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2-3, p. 141-146, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (FAO). **Statistical Yearbook**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 30 Jan. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. (FAO/WHO). **Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites**. Roma: FAO, 2014. 324 p. Microbiological Risk Assessment Series, n.23. Disponível em: <www.fao.org/3/a_i3649e.pdf>. Acesso em: 29 Jan.2015.

FRANCO, P. S.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; GOMES, A. O.; SILVA, A. L.; PENA, J. D.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Callomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strains. **Placenta**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 2011.

FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; IETTA, F.; SHWAB, E. K.; SU, C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strains and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 181, p. 1-13, 2015.

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.

GEBREMEDHIN, E. Z.; ABDURAHAMAN, M.; TESSEMA, T. S.; TILAHUN, G.; COX, E.; GODDEERIS, B.; DORNY, P.; DE CRAEYE, S.; DARDÉ, M. L.; AJZENBERG, D. Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 425, 2014.

GONDIM, L. F. P.; BARBOSA JR, H. D.; RIBEIRO FILHO, C. H. A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goat, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p.273-276, 1999.

HARVEY, J. W. **Veterinary Hematology: a diagnostic guide and color atlas**, Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012. 360 p.

HERRMANN, D. C.; MAKSIMOV, P.; HOTOP, A.; GROß, U.; DÄUBENER, W.; LIESENFELD, O.; PLEYER, U.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Genotyping of samples from German patients with ocular, cerebral and systemic toxoplasmosis reveals a predominance of *Toxoplasma gondii* type II. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 911-916, 2014.

HIDE, G.; MORLEY, E. K.; HUGHES, J. M.; GERWASH, O.; ELMAHAISHI, M. S.; ELMAHAISHI, K. H.; THOMASSON, D.; WRIGHT, E. A.; WILLIAMS, R. H.; MURPHY, R. G.; SMITH, J. E. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 136, p. 1877-1885, 2009.

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

INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; BUXTON, D.; KATZER, F. Ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 136, p. 1887-1894, 2009.

INNES, E. A.; VERMEULEN, A. N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. **Parasitology**, v. 133, p. 145-168, 2006.

INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Analysis of in vivo immune responses during *Toxoplasma gondii* infection using the technique of lymphatic cannulation. **Parasitology Today**, v. 11, p. 268-271, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (IBGE). **Censo Agropecuário 2006**. 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 05/03/2015.

KANEKO, J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. Waltham: Academic Press, 1997. 932 p.

KATZER, F.; CANTON, G.; BURRELLS, A.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; HORTON, B.; BARTLEY, P. M.; PANG, Y.; CHIANINI, F.; INNES, E. A.; BENAVIDES, J. Immunization of lambs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* reduces tissue cyst burden following oral challenge with a complete strain of the parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 46-56, 2014.

KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J.P.; DARDE, M.L.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L.D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, p. 14872–14877, 2007.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT JR, R.; VITOR, R. W.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1359-1370, 2008.

LANGONI, H.; GRECA JÚNIOR, H.; GUIMARÃES, F. F.; ULLMANN, L. S.; GAIO, F. C.; UEHARA, R. S.; ROSA, E. P.; AMORIM, R. M.; DA SILVA, R. C. Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in comercial sheep from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 50-54, 2011.

LOPES, F. M. R.; GONÇALVES, D. D.; DOS REIS, D. R.; BREGANÓ, R. M.; FREIRE, R. L.; DE FREITAS, J. C.; NAVARRO, I. T. Presence of domesticated cats and visual impairment associated to *Toxoplasma gondii* seropositive children at an elementary school in Jataizinho, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 12-15, 2008.

LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J.; SANTANA, L. F.; SANTOS, R. S.; ROSSANESE, W. M.; COSTA, G. H. N.; SAKAMOTO, C. A. M.; SANTOS, T. R. Aspects of *Toxoplasma* infection in the reproductive system of experimentally infected rams (*Ovis aries*). **Journal of Parasitology Research**, v. 9, p. 1-6, 2009a.

LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J.; SOUZA, F. A.; RODRIGUES, J. F.; COSTA, G. H. N.; SOARES, V. E.; SILVA, G. S. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 312-319, 2009b.

LUCIANO, D. M.; MENEZES, R. C.; FERREIRA, L. C.; NICOLAU, J. L.; DAS NEVES, L. B.; LUCIANO, R. M.; DAHROUG, M. A. A.; AMENDOEIRA, M. R. R. Soroepidemiologia da toxoplasmose em caprinos e ovinos do Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 569-574, 2011.

MANGEN, M. J.; BOUWKNEGT, M.; FRIESEMA, I. H. M.; HAAGSMA, J. A.; KORTBEEK, L. M.; TARIQ, L.; WILSON, M.; VAN PELT, W.; HAVELAAR, A. H. Cost-of-illness and disease burden of food related pathogens in the Netherlands, 2011. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 84-93, 2014.

MARCOS, R.; SANTOS, M.; MALHÃO, F.; PEREIRAS, R.; FERNANDES, A.C.; MONTENEGRO, L.; ROCCABIANCA, P. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 201-205, 2009.

MCCOLGAN, C.; BUXTON, D.; BLEWETT, D. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. **Veterinary Record**, v. 123, n. 18, p. 467-470, 1988.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO JR, A. J.; ANDRADE JR, H. F. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Veterinary Science**, v. 40, n. 4, p. 267-271, 2003.

MENDES, N. H.; OLIVEIRA, C. B.; GARCIA, C. A.; HOLANDA, C. M.; ANDRADE-NETO, V. F. Epidemiological and serological profiles of ocular toxoplasmosis in the municipality of Natal, northeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 10, p. 656-651, 2014.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis**. 3. ed. Saint Louis: Saunders, 2004. 368 p.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. C.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 23-39, 2009.

MINOT, S.; MELO, M. B.; LI, F.; LU, D.; NIEDELMAN, W.; LEVINE, S. S.; SAEJI, J. P. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, n. 33, 2012.

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

MUNDAY, B. L. Transmission of *Toxoplasma* infection from cronically infected ewes to their lambs. **British Veterinary Journal**, v. 128, p. 71-72, 1972.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du *gondii*. Complex Rendues. **Academy of Sciences**, v. 147, p. 736, 1908.

NOGUEIRA, A. H. C.; CHIEBAO, D. P.; VILLALOBOS, E. C. M. Sanidade na Ovinocultura. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, n. 24, 2011. 86 p.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, n. 1-2, p. 27-32, 1980.

OPSTEEGH, M.; KORTBEEK, T. M.; HAVELAAR, A. H.; VAN DER GIESSEN, W. B. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 1, p. 101-107, 2015.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.

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

PESCADOR, C. A.; OLIVEIRA, E. C.; PEDROSO, P. M. O.; BANDARRA, P. M.; OKUDA, L. H.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 167-171, 2007.

PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGAS, A.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN- γ . **Parasitology**, v. 134, p. 1895-1902, 2007. Número Especial, 13.

PINHEIRO, J. W.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; FARIA, E. B.; GONDIM, L. F. P.; DA SILVA, A. V.; ANDERLINI, G. A. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 105, n. 3, p. 709-715, 2009.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 279, 1992.

PUGH, D. G. **Sheep and goat medicine**. Philadelphia: WB Saunders, 2005. 468 p.

RAGOZO, A. M.; YAI, R. L.; OLIVEIRA, L. N.; DIAS, R. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo state, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1259-1263, 2008.

RAGOZO, A. M. A.; PENA, H. F. J.; YAI, L. E. O.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 307-312, 2010.

REMYINGTON, J. S.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O.; WILSON, C. B.; BAKER, C. J. **Infectious disease of the fetus and newborn infant**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. cap. 4, p. 143-146.

ROBERT-GANGNEUX, F.; MURAT, J. B.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; GANGNEUX, J. P.; PELLOUX, H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 12, p. 530-536, 2011.

RODGER, S. M.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E.; MACKELLAR, A.; WELEY, F.; SALES, J.; BUXTON, D. Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep. **Veterinary Records**, v. 159, p. 768-771, 2006.

ROMANELLI, P. R.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V. S. O.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 202-207, 2007.

ROSSI, G. F.; CABRAL, D. D.; RIBEIRO, D. P.; PAJUABA, A. C. A. M.; CORRÊA, R. R.; MOREIRA, R. Q.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 252-259, 2011.

SAKAMOTO, C. A. M.; DA COSTA, A. J.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J.; TONIOLLO, J. H.; LOPES, W. D. Z.; BICHUETTE, M. A.; BETINI, C. M.; AMARANTE, A. F. T.; BRESCIANI, K. D. S. Experimental infection of pregnant queens with two major Brazilian clonal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1311-1316, 2009.

SANTANA, A. M.; DA SILVA, D. G.; BERNARDES, P. A.; PIZAURO, L. J. L.; MALUTA, R. P.; AQUINO, G. V.; GARCIA, K. O.; ÁVILA, F. A.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e perfil bioquímico sérico de ovinos em idade de abate. **Ciência Animal Brasileira**, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7766/5565>>. Acesso em: 09 Jan. 2015.

SAWYER, M.; MOE, J.; OSBURN, B. I. Ontogeny of immunity and leukocytes in the ovine fetus and elevation of immunoglobulins related to congenital infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 4, p. 643-648, 1978.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Pullman: Current Conceptions, 2003. 373 p.

SHIMOKAWA, P. T. **Estudos de alelos do HLA-DQA1 e DQB1 em fetos com toxoplasmose: associação com os genótipos parasitários.** 2013. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual Review Microbiology**, v. 62, p. 329–351, 2008.

SIEGEL; S. **Estatística não paramétrica.** São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981. 288 p.

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

SIQUEIRA, E. R. Cria e recria de cordeiros em confinamento. In: DA SILVA SOBRINHO, A. G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L. **Nutrição de ovinos**, Jaboticabal: FUNEP – FCAJ – UNESP, 1996. p. 175-212.

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

SOARES, R. M.; LOPES, E. G.; KEID, L. B.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 168-172, 2011.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesion anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kalazar dell'uoma. Nota preliminare. **Review of the Societie of Sciences**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOUC, P.; MAJUMDARA, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.; ZHUF, X.; AJIOKAG, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences**, v. 109, n. 15, p. 5844–5849, 2012.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 841-848, 2006.

TARGA, L. S. **Estudo da carga parasitária e dos genótipos de *Toxoplasma gondii* na toxoplasmose congênita**. 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

UENO, H; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed., Porto Alegre: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

UENO, T. E. H.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; DILLI, T. L. B.; AKIMOTO, B. M.; DE SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 547-552, 2009.

VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA System for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 509-529, 2002.

WASTLING, J. M.; HARKINS, D.; MALEY, S.; INNES, E.; PANTON, W.; THOMSON, K.; BUXTON, D. Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, n. 1, p. 53-62, 1995.

WATSON, W. A.; BEVERLEY, J. K. A. Epizootics of toxoplasmosis causing ovine abortion. **Veterinary Record**, v. 88, p. 120-124, 1971.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. 1206 p.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 895-901, 2009.

WENDTE, J. M.; MILLER, M. A.; LAMBOURN, D. M.; MAGARGAL, S. L.; JESSUP, D. A.; GRIGG, M. E. Self-mating in the definitive host potentiates clonal out- breaks of the Apicomplexan parasites *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii*. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 12, 2010.

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

YOKUS, B.; ÇAKIR, D. U.; KANAY, Z.; GULTEN, T.; UYSAL, E. Effects of Seasonal and Physiological Variations on the Serum Chemistry, Vitamins and Thyroid Hormone Concentrations in Sheep. **Journal of Veterinary Medicine, Series A**, v. 53, p. 271–276, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. Harlow: Pearson, 2013. 760 p.

APÊNDICE A – ANÁLISES SOROLÓGICAS (RIFI) DOS GATOS UTILIZADOS NO BIOENSAIO PARA OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE *T. GONDII*. DPI = DIAS APÓS INFECÇÃO. NEGATIVO = TÍTULO < 16. NR = NÃO REALIZADO. *INÍCIO DE ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS.

DPI	GENÓTIPO BrI		GENÓTIPO BrIII		
	Gato 1	Gato 2	Gato 3	Gato 4	Gato 5
0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	NR	Negativo*	Negativo	Negativo
5	Negativo*	NR	Negativo	Negativo*	Negativo*
6	NR	Negativo*	NR	NR	NR
7	NR	Negativo	NR	NR	NR
14	NR	NR	NR	256	1024
15	128	128	512	NR	NR

APÊNDICE B – TABELA E GRÁFICO COM ANÁLISE QUALITATIVA DA VARIAÇÃO DA MÉDIA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E DE BIOQUÍMICA SÉRICA DURANTE A REINFECÇÃO NOS ANIMAIS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E MESMO PERÍODO NO GRUPO CONTROLE.

		PARÂMETROS				
		CLÍNICOS	BIOQUÍMICA	HEMOGRAMA	LEUCOGRAMA	MÉDIA
Controle	OVELHA 14	0,00	0,23	0,19	0,01	0,11
	OVELHA 15	0,00	0,24	0,06	0,03	0,08
	OVELHA 16	0,00	0,18	0,17	0,06	0,10
	OVELHA 17	0,00	0,32	0,06	0,04	0,11
	OVELHA 18	0,00	0,23	0,24	0,11	0,15
Grupo 1	OVELHA 2	0,29	0,25	0,03	0,09	0,16
	OVELHA 1	0,57	0,24	0,19	0,03	0,26
	OVELHA 3	0,57	0,23	0,12	0,02	0,24
	OVELHA 4	0,29	0,17	0,05	0,02	0,13
Grupo 2	OVELHA 6	0,86	0,26	0,17	0,10	0,35
	OVELHA 5	0,57	0,21	0,07	0,00	0,21
	OVELHA 9	0,29	0,25	0,21	0,04	0,20
	OVELHA 7	0,29	0,31	0,03	0,08	0,18
	OVELHA 8	0,29	0,27	0,06	0,04	0,17
Grupo 3	OVELHA 12	0,57	0,14	0,13	0,01	0,22
	OVELHA 13	0,86	0,33	0,09	0,01	0,32
	OVELHA 10	0,57	0,13	0,08	0,04	0,21
	OVELHA 11	0,29	0,30	0,30	0,02	0,23