

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

LUCIANA SALLES VASCONCELOS HENRIQUES

**INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM
OVINOS: DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO E MOLECULAR NO ANIMAL E
CARNES COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS
GOYTACAZES, RJ**

Campos dos Goytacazes

Março - 2015

LUCIANA SALLES VASCONCELOS HENRIQUES

INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM OVINOS:
DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO E MOLECULAR NO ANIMAL E CARNES
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS
GOYTACAZES, RJ

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal, na Área de Concentração de
Sanidade Animal.

ORIENTADOR Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

COORIENTADOR Dr. Edwards Frazão-Teixeira

Campos dos Goytacazes

Março - 2015

LUCIANA SALLES VASCONCELOS HENRIQUES

INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM OVINOS:
DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO E MOLECULAR NO ANIMAL E CARNES
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS
GOYTACAZES, RJ

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal, na Área de Concentração de
Sanidade Animal.

Aprovada em 11 de março de 2015

BANCA EXAMINADORA:

Helene Santos Barbosa – (Doutora, Biologia Celular e Molecular) – Fiocruz

Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos – (Doutor, Ciências) – UENF

Edwards Frazão-Teixeira (Doutor, Ciência Animal) – Fiocruz
(Coorientador)

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira (Doutor, Ciências Veterinárias) – UENF
(Orientador)

Aos

Meus avós, por toda a generosidade, carinho e,
principalmente, por serem os meus maiores
professores na vida,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado em meu caminho, ao longo desse trabalho, pessoas que me inspiraram, me ajudaram e me encorajaram a terminar essa importante etapa da minha vida;

À Nossa Senhora das Graças, por sempre interceder por mim junto a Deus, pela sua proteção, graças e bênçãos concedidas e por nunca me desamparar;

Aos meus pais, RENATO VASCONCELOS HENRIQUES e CIBELE DE SOUZA SALLES VASCONCELOS HENRIQUES, que sempre primaram pela minha educação e se fizeram presentes em todos os sentidos. Sem dúvida alguma, eles são os principais responsáveis pela concretização desse momento;

A minha irmã, ANA CAROLINA SALLES VASCONCELOS HENRIQUES BATOULI, meu grande exemplo e de quem sempre ouvi as maiores palavras de incentivo, e ao meu cunhado FREDERICO OTÁVIO SAWAF BATOULI, pessoa admirável pelo esforço e determinação e por, junto com a minha irmã, terem me presenteado com a maior alegria da minha vida, o meu afilhado THEO BATOULI HENRIQUES;

Ao meu namorado TOMÁS AZEVEDO CHECHETI DEVOLDER, pelo imenso incentivo e por encher a minha vida de sonhos e alegria;

A todos os meus familiares, por compreenderem a minha ausência em tantos momentos necessários e por me permitirem sentir o amor deles, mesmo à distância; um agradecimento especial a minha madrinha, LÍGIA VASCONCELOS HENRIQUES, por todo o carinho e auxílio durante a minha vida acadêmica;

À amiga de laboratório e doutoranda AMANDA LUCÍA JIMÉNEZ-SANZ, por todos os ensinamentos e auxílios durante a execução dos experimentos e, principalmente, pela amizade que ficará além das fronteiras;

À amiga ANNA PAULA MARTINS DE CARVALHO, por estarmos completando esta importante etapa e irmos caminhando, juntas, desde a graduação;

Ao professor orientador Dr. FRANCISCO CARLOS RODRIGUES DE OLIVEIRA, por ter me acolhido no Doutorado e por deixar em mim um exemplo de caráter e profissionalismo;

Ao coorientador Dr. EDWARDS FRAZÃO-TEIXEIRA, por todos os ensinamentos, correções, contribuições, pela paciência e amizade durante esses quatro anos;

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, pela formação profissional desde a graduação e por ter sido a minha segunda casa durante esses 11 anos. É com imensa gratidão a essa instituição de ensino que termino essa jornada;

Ao INSTITUTO VITAL BRAZIL, por ter fornecido uma parcela dos camundongos utilizados na pesquisa, e aos seus funcionários, pela atenção disponibilizada;

Ao prof. Dr. CLÓVIS DE PAULA SANTOS, por ter autorizado a utilização do Biotério da UENF para a realização de parte do experimento, além do fornecimento de animais, e aos funcionários deste local, pela imensa colaboração durante essa etapa;

À médica especialista em genética Dra. CONCY CALDEIRA MAIA, e a todos os funcionários do Laboratório Sonda do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, pela colaboração durante a realização de uma etapa do experimento;

Aos professores e funcionários da UENF, pela colaboração prestada sempre que solicitada;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo suporte financeiro durante o Doutorado.

À Banca Examinadora, pelas considerações, sugestões e atenção dispensada.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

MARTIN LUTHER KING

RESUMO

Henriques, Luciana Salles Vasconcelos, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2015. Investigação da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos: diagnóstico biológico e molecular no animal e carnes comercializadas no município de Campos dos Goytacazes, RJ. Orientador: Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Coorientador: Dr. Edwards Frazão-Teixeira.

Este estudo teve como principal objetivo isolar e caracterizar biológica e geneticamente linhagens de *T. gondii* presentes nas carnes de ovinos comercializadas em açougues e em tecidos de ovinos naturalmente infectados. Foram coletadas 31 amostras de carne ovina, sendo 20 de açougues (14 congeladas e seis resfriadas) e 11 nos outros estabelecimentos (uma congelada e 10 refrigeradas). Também foram coletadas amostras sanguíneas de 50 ovinos, seguido da aplicação do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) nos respectivos soros, nas diluições de 1:25 a 1:3200. As amostras dos tecidos ovinos e das carnes adquiridas no comércio foram digeridas em pepsina e submetidas à prova biológica em camundongos. Nenhuma cepa foi isolada das carnes dos açougues, assim como também não foi encontrado DNA do parasito nestas amostras. Anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em 37 dos 50 animais (74%). Cinco destes com titulação \geq 1:3200 foram selecionados, dos quais diversos tecidos foram coletados. Foram obtidos quatro isolados dos tecidos ovinos, designados TgShBr17-20. Amostras de pulmão e cérebro dos camundongos que vieram a óbito e positivos para *T. gondii* foram coletadas para realização do seqüenciamento. A caracterização genética permitiu identificar um novo genótipo atípico comum aos quatro isolados. Os resultados confirmam a elevada diversidade genética de *T. gondii* no Brasil e demonstram que animais assintomáticos podem ser portadores de cepas altamente virulentas a camundongos e, desta forma, representarem um risco à saúde humana.

Palavras-chave: Toxoplasmose; *Ovis aries*; genotipagem; PCR.

ABSTRACT

Henriques, Luciana Salles Vasconcelos, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March; 2015. Investigation of infection by *Toxoplasma gondii* in sheep: biological and molecular diagnosis in animals and meat sold in Campos dos Goytacazes municipality, RJ. Advisor: Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Co-Advisor: Dr. Edwards Frazão-Teixeira.

This study aimed at isolating and characterizing biological and genetically strains of *T. gondii* found in sheep meat sold in butcher shops and in naturally infected sheep tissues. Thirty-one sheep meat samples were collected, 20 from butchers (14 frozen and six chilled) and 11 from other establishments (one frozen and 10 chilled). Blood samples from 50 sheep were also collected, followed by application of Modified Agglutination Test (MAT) in their sera, at dilutions of 1:25 to 1: 3200. Sheep tissues samples and meat acquired in trade were digested in pepsin and submitted to biological test in mice; no strain was isolated from the meat collected in butcher shops, as well as the parasite DNA was not found in these samples. Anti-*T. gondii* antibodies were detected in 37 of 50 animals (74%). Five of these with titration \geq 1: 3200 were selected, of which various tissues were collected. Four isolates were obtained from sheep tissue, designated TgShBr17-20. Mice's lung and brain samples that died and were positive for *T. gondii* were collected to perform sequencing. Genetic characterization identified a new common atypical genotype to four isolates. Results confirm the high genetic diversity of *T. gondii* in Brazil and show that asymptomatic animals can be carriers of highly virulent strains to mice and thus present a risk to human health.

Key-words: Toxoplasmosis; *Ovis aries*; genotyping; PCR.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos no mundo nos últimos cinco anos.....	29
Quadro 2	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos no Brasil (adaptado de Dubey et al., 2012).....	30
Quadro 3	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> viáveis de tecidos de ovinos naturalmente infectados no Brasil.....	33
Quadro 4	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> viáveis de tecidos de ovinos naturalmente infectados no mundo.....	35
Quadro 5	Amostras de carne ovina adquiridas em açougues e com vendedores de churrasco em espeto nos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana, RJ.....	42
Quadro 6	Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações primárias e secundárias de <i>nested-PCRs</i> de cada isolado de <i>Toxoplasma gondii</i>	50
Quadro 7	Descrição das sequências dos iniciadores utilizados para as amplificações primária e secundária de <i>nested-PCRs</i>	51
Quadro 8	Programa para as amplificações primária e secundária de <i>nested-PCRs</i> realizadas em tecidos ovinos no município de Campos dos Goytacazes, RJ, para detecção de fragmentos de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i>	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> (adaptado de Dubey et al., 1998).....	21
Figura 2	Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos (adaptado de Dubey, 1998a).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição da titulação de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos de uma propriedade do município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	54
Tabela 2	Infectividade e mortalidade de camundongos inoculados com tecidos de ovinos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> oriundos de uma propriedade do município de Campos dos Goytacazes, RJ...	55
Tabela 3	Genótipos multi-locus de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> em tecidos de ovinos de uma propriedade do município de Campos dos Goytacazes, Brasil, através da técnica “multi-locus DNA sequencing”.....	56
Tabela 4	Caracterização genética de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> através da “multi-locus DNA sequencing” no Brasil.....	58
Tabela 5	Nucleotídeos atípicos (em destaque) detectados pela técnica “multi-locus DNA sequencing” nas sequências de DNA do marcador molecular GRA6 para <i>T. gondii</i> nos quatro isolados de tecidos ovinos de uma propriedade no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	59

LISTA DE SIGLAS

APDL	“Animal Parasitic Diseases Laboratory”
BSA	“Bovine serum albumin” (Albumina sérica bovina)
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
DAI	Dias após a inoculação
DAT	“Direct Agglutination Test” (Teste de Aglutinação Direta)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
DT	“Dye Test” (“Sabin-Feldman Test”)
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Reação Imunoenzimática)
IBqM	Instituto de Bioquímica Médica
IFAT	“Indirect Fluorescent Antibody Test”(Reação de Imunofluorescência Indireta)
IHA	“Indirect Haemagglutination Test” (Teste de Hemoaglutinação Indireta)
LAT	“Latex Agglutination Test” (Teste de Aglutinação em Látex)
MAT	“Modified Agglutination Test” (Teste de Aglutinação Modificado)
n-PCR	“ <i>nested</i> Polymerase Chain Reaction”
NUPAP	Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia
LSA	Laboratório de Sanidade Animal
PBS	“Phosphate buffered Saline” (Tampão salina fosfato)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorfism”
rpm	Rotações por minuto
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	GERAL.....	18
2.2	ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	19
3.1.1	Taxonomia	19
3.1.2	Histórico	19
3.1.3	Ciclo biológico	20
3.1.3.1	Importância da transmissão por cistos teciduais.....	23
3.2	EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE	25
3.2.1	Toxoplasmose em Campos dos Goytacazes	25
3.2.2	Toxoplasmose em ovinos	26
3.2.2.1.	Fatores de risco relacionados à soroprevalência.....	26
3.2.2.2	Soroprevalência.....	27
3.2.2.3	Isolamento.....	31
3.2.2.4	Caracterização genética.....	36
3.3	TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	LOCAL DA PESQUISA.....	41
4.2	LEVANTAMENTO DOS AÇOUGUES.....	41
4.3	SELEÇÃO DOS OVINOS.....	42
4.4	AVALIAÇÃO SOROLÓGICA.....	43
4.5	AQUISIÇÃO DOS ANIMAIS.....	43
4.6	PROVA BIOLÓGICA.....	44
4.6.1	Digestão péptica das amostras	44

4.6.2	Isolamento primário em camundongos	45
4.6.2.1	Eutanásia dos camundongos.....	45
4.6.2.2	Inoculação.....	45
4.6.2.3	Período de observação e isolamento.....	46
4.6.2.3.1	<i>Técnica de preparo de esfregaço de pulmão em lâminas</i>	46
4.6.2.3.2	<i>Técnica para observação direta de cisto cerebral</i>	47
4.7	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	47
4.7.1	Extração de DNA	47
4.7.2	Multi-locus DNA sequencing	48
5	RESULTADOS	54
5.1	AVALIAÇÃO SOROLÓGICA	54
5.2	PROVA BIOLÓGICA EM CAMUNDONGOS	54
5.3	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO	55
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a carne ovina era considerada um artigo de luxo (MATURANO, 2003), embora tenha ocorrido um aumento significativo em sua demanda há alguns anos, principalmente nos grandes centros urbanos, como reflexo das mudanças dos hábitos alimentares do consumidor. Este fato vem contribuindo para a expansão da ovinocultura e, desta forma, para o aumento da oferta de uma fonte de proteína de alta qualidade (FRANÇA, 2006).

Dentre as enfermidades que acometem os ovinos, a toxoplasmose tem grande importância, tanto pelos aspectos reprodutivos como também por esta espécie poder albergar o parasito em seus tecidos. Para os seres humanos, a ingestão de carne ovina mal passada é considerada uma das principais fontes de infecção por *Toxoplasma gondii* em todo o mundo (DUBEY, 2010).

Cepas do parasito obtidas de tecidos de diversos animais de produção no Brasil foram caracterizadas geneticamente, com a demonstração de alta variabilidade genotípica em contraste com países do hemisfério norte, onde cepas clonais são mais comuns. Devido a essa diversidade, a técnica comumente utilizada para caracterizar geneticamente as cepas de *T. gondii*, multi-locus PCR-RFLP, é falha para o estudo de cepas brasileiras, visto que foi inicialmente padronizada para estudar as linhagens clonais encontradas na América do Norte, Europa e África. Em trabalho realizado com isolados de *T. gondii* de tecidos suínos comercializados no município de Campos dos Goytacazes, foi estabelecido que somente a técnica “multi-locus DNA sequencing” é capaz de detectar a real diversidade genética de cepas brasileiras e sulamericanas. Este município é internacionalmente citado pela epidemia de toxoplasmose humana e animal, com relatos de alto percentual em indivíduos de baixa renda e doença congênita (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). Vários estudos foram realizados a fim de detectar a principal fonte de infecção humana nesta cidade (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014; DUBEY et al., 2003; FRAZÃO-TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2011; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; SILVA et al., 2003a), os quais comprovaram a ampla contaminação ambiental (SILVA et al., 2003a) e ponderaram acerca do papel de fontes de água na epidemiologia da doença (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). No

Brasil já existem relatos, apesar de escassos, de isolamento de *T. gondii* viáveis de tecidos de ovinos naturalmente infectados (MACIEL et al., 2014; RAGOZO et al., 2008; SILVA e LANGONI, 2001; SILVA et al., 2011; SPÓSITO FILHA et al., 1992). Atualmente, apenas uma pesquisa apresenta dados moleculares por sequenciamento para caracterização genética de cepas isoladas de ovinos (MACIEL et al., 2014). Desta forma, justifica-se um trabalho que determine a caracterização biológica e genética de isolados de *T. gondii* em ovinos no município de Campos dos Goytacazes, tendo em vista que o consumo desta carne pode ser determinante na cadeia epidemiológica desta importante parasitose.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

A presente pesquisa teve como principal objetivo isolar e caracterizar biológica e geneticamente linhagens de *T. gondii* presentes nas carnes de ovinos comercializadas em açougues e por vendedores de churrasco em espeto dos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco do Itabapoana, RJ e em tecidos de ovinos com alta titulação de anticorpos anti-*T. gondii* em propriedade de criação comercial do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de *T. gondii* viável em tecidos de ovinos com alta titulação de anticorpos anti-*T. gondii* em propriedade de criação comercial do município de Campos dos Goytacazes, RJ;
- Determinar a infectividade e virulência em camundongos das cepas de *T. gondii* isoladas;
- Identificar os genótipos de *T. gondii* em isolados das carnes de ovinos comercializadas em açougues e por vendedores de churrasco em espeto nos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco do Itabapoana, RJ e em tecidos de ovinos naturalmente infectados no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é a única espécie do gênero *Toxoplasma* e um coccídio altamente patogênico, que tem como hospedeiros intermediários os animais de sangue quente e como hospedeiro definitivo o gato e outros felídeos (DUBEY, 2010).

3.1.1 Taxonomia

De acordo com *The National Center for Biotechnology Information, NCBI* (2014), o agente etiológico da toxoplasmose é classificado como se segue:

Filo: Apicomplexa

Classe: Coccidia

Ordem: Eucoccidiorida

Subordem: Eimeriorina

Família: Sarcocystidae

Gênero: *Toxoplasma*

Espécie: *Toxoplasma gondii*

3.1.2 Histórico

Toxoplasma gondii foi descrito há pouco mais de 100 anos por Nicolle e Manceaux (1908). Estes pesquisadores acidentalmente descobriram este

protozoário no Instituto Pasteur de Tunis, na África, em estudos relacionados a um reservatório de *Leishmania* em *Ctenodactylus gundi*, um roedor nativo desta região. No ano seguinte, diante da descoberta de um novo microrganismo, nomearam-no *T. gondii* baseados em duas características: sua morfologia (do grego: toxo=arco; plasma=forma) e o hospedeiro em que foi originalmente isolado, o roedor *C. gundi* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909).

O potencial patogênico de *T. gondii* foi descrito por diversos autores a partir da década de 1920 sendo que, em 1937, a clássica tríade de sintomas associada à toxoplasmose congênita humana (hidrocefalia, retinocoroidite e encefalite) foi determinada (WOLF e COWEN, 1937). A importância médico-veterinária de *T. gondii* teve início, de fato, a partir de 1950, década em que este coccídio foi associado à causa de abortamentos em ovelhas na Nova Zelândia (HARTLEY e MARSHAL, 1957). Este achado foi de suma importância para o levantamento de questões acerca de potenciais novas rotas de transmissão deste parasito. A padronização dos testes sorológicos, em especial o teste de Sabin-Feldman (1948), levou ao reconhecimento de que *T. gondii* é um parasito comum em animais de sangue quente com distribuição em todo o mundo. Até 1970, no entanto, apenas os estágios assexuados (taquizoítos e bradizoítos) eram conhecidos. A partir desta década, o ciclo sexuado e o oocisto (estágio de resistência ambiental), foram descritos por Dubey et al. (1970).

3.1.3 Ciclo biológico

Toxoplasma gondii caracteriza-se por apresentar elevada prevalência tanto em humanos quanto em animais. Este protozoário tem um ciclo heteroxeno, no qual os felídeos são considerados hospedeiros definitivos, com uma fase sexuada nas células epiteliais do intestino delgado (enterócitos) e outra assexuada em outros tecidos, o que inclui todas as células nucleadas. O homem e outros animais de sangue quente, incluindo mamíferos e aves, são considerados hospedeiros intermediários, apresentando apenas o ciclo assexuado, com formação de cistos em

seus tecidos, predominantemente no cérebro e musculatura esquelética (DUBEY et al., 1998).

Os três estágios infecciosos conhecidos são denominados taquizoítos (forma livre), bradizoítos e esporozoítos (DUBEY, 1998a). A infecção pode ser adquirida pelo hospedeiro intermediário por três vias principais: ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítos presentes em alimentos ou água contaminados; ingestão de cistos contendo bradizoítos em carne crua ou mal cozida, principalmente de suínos e ovinos; congênita ou transplacentária, em que hospedeiros não imunes são infectados por taquizoítos circulantes em infecções agudas durante a gestação (Figura 1). Neste último caso, o parasito atinge o feto após se multiplicar na placenta, tendo como possíveis consequências abortamentos ou lesões congênitas irreversíveis. Também cabe citar como causas de infecção as transfusões sanguíneas e os transplantes de órgãos (DUBEY, 1994, 1998a).

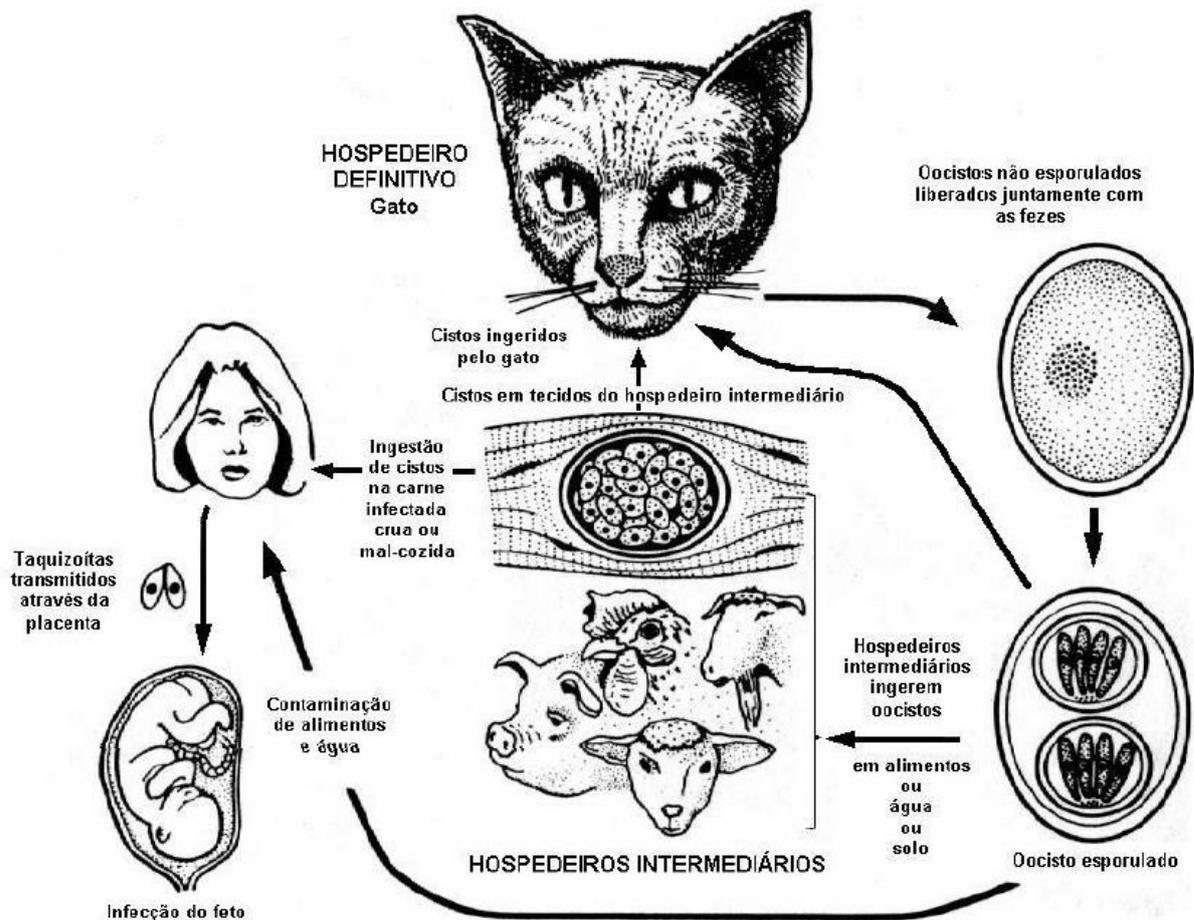


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (adaptado de DUBEY et al., 1998).

A fase assexuada em um hospedeiro susceptível ocorre após a ingestão de um dos três estágios infecciosos, como citado anteriormente. Cada esporozoíto ou bradizoíto liberado no tubo digestivo sofre intensa multiplicação intracelular na forma de taquizoítos e, após rápida passagem pelo epitélio intestinal, invadem vários tipos de células do organismo. Nestas, os taquizoítos se multiplicam e, eventualmente, encistam em diversos tecidos, especialmente no cérebro e musculatura esquelética (DUBEY e FRENKEL, 1976; DUBEY, 2010), onde podem persistir até mesmo por toda a vida do hospedeiro (DUBEY, 1998a). Nos tecidos, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos por mudarem da forma de proliferação rápida, responsável pela fase aguda da doença, para uma fase de multiplicação mais lenta, denominada fase crônica ou latente da toxoplasmose, com o desenvolvimento da resposta imune específica do organismo (DUBEY, 1994). Esta fase cística pode permanecer por um longo período ou, por mecanismos ainda não esclarecidos inteiramente (diminuição da imunidade ou da resistência e alteração hormonal, por exemplo), poderá haver reagudização, com sintomatologia semelhante à primoinfecção (KAWAZOE, 2010).

O gato pode se infectar quando ingere cistos teciduais, sendo que a parede destes é rompida por ação de ácidos e enzimas estomacais, os quais continuam a atuação no intestino delgado. Os parasitos que atingem a lâmina própria do intestino vão se diferenciar em taquizoítos, multiplicar e disseminar para outros tecidos por meio do sangue e da linfa. Outros bradizoítos penetram nos enterócitos e dão início ao desenvolvimento de numerosas gerações de *T. gondii*. Ocorre o desenvolvimento inicial de cinco tipos morfológicamente distintos deste parasito, chamados esquizontes ou estágios enteroepiteliais (tipos: A, B, C, D, E). Os esquizontes se multiplicam exclusivamente nos enterócitos dos felídeos e dão origem aos merozoítos até que ocorra a formação dos gametas feminino (macrogametas) e masculino (microgametas) (DUBEY e FRENKEL, 1972; FRENKEL e DUBEY, 1972). Na reprodução sexuada, o macrogameta é fertilizado pelo microgameta, originando o zigoto e dando início à formação da parede do oocisto. Os oocistos são liberados juntamente com as fezes dos gatos em sua forma não esporulada. Apenas no ambiente o potencial infeccioso será adquirido por meio da esporogonia, processo esse que envolve uma alteração na estrutura do oocisto e resulta na formação de dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada, após um período de cerca de

dois dias. Em condições de umidade, temperatura e ambiente favoráveis, o oocisto é capaz de se manter infectante por cerca de 12 a 18 meses (Dubey et al ., 1970; revisto por DUBEY et al., 1998).

O tempo decorrido entre a infecção e o aparecimento de oocistos nas fezes dos felídeos (período pré-patente) varia de acordo com a forma infectante ingerida pelos mesmos. O período pré-patente é mais longo (13 dias ou mais) após a ingestão de taquizoítos ou oocistos quando comparado ao período mais curto que ocorre após a ingestão de bradizoítos (3 a 10 dias) (DUBEY, 1998).

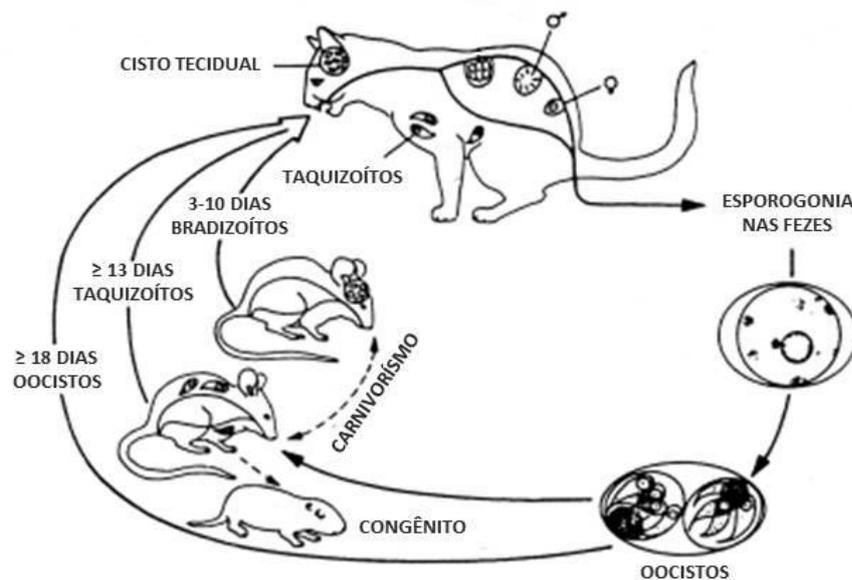


Figura 2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* em gatos (adaptado de DUBEY, 1998a).

3.1.3.1 Importância da transmissão por cistos teciduais

Os cistos teciduais possuem grande importância no ciclo biológico de *T. gondii*, uma vez que a forma cística é o estágio final do parasito a ser consumido por animais, incluindo o homem. A ingestão de carnes e produtos de origem animal, crus ou mal passados, possui papel fundamental na epidemiologia da toxoplasmose. Cistos teciduais viáveis são encontrados em animais naturalmente infectados,

particularmente em ovinos e suínos (DUBEY, 2010). Em bovinos, no entanto, estes achados são extremamente raros (DUBEY, 2010).

Diversos surtos desta enfermidade estão associados a hábitos alimentares. Algumas pesquisas apontam mais fortemente a carne como fonte de infecção humana do que os gatos (DUBEY, 2010). Entre o consumo de carne infectada, a carne ovina é uma das principais fontes de *T. gondii* em todo o mundo (DUBEY e JONES, 2008).

No Brasil, um relato interessante foi feito por Bonametti et al. (1997), no qual foram reportados 17 casos de toxoplasmose aguda sintomática adquirida pela ingestão de carne crua de carneiro (na forma de quibe), servida em uma festa na cidade de Bandeirantes, PR em 1993. No referido evento, todos os pacientes (nove do sexo feminino e oito do sexo masculino) compareceram e apresentaram quadro clínico e perfil sorológico compatíveis com a infecção aguda. A faixa etária variou de seis a 57 anos, sendo que apenas um paciente tinha menos de 10 anos de idade (seis anos), 13 tinham entre 20 e 40 anos e três tinham mais de 40 anos. A primeira consulta ocorreu 14 dias após o dia da festa e o acompanhamento do paciente se estendeu por um mês. Os pacientes responderam a um questionário no qual constavam dados sobre identificação, informações epidemiológicas e histórico clínico. Nenhum paciente relatou contato direto com gatos ou ingestão de carne crua de qualquer espécie, a não ser a ingerida na festa. O período de incubação da doença variou de seis a 13 dias. Dos 17 casos mencionados, 16 (94,5%) foram caracterizados por quadros de febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia e adenomegalia (cervical ou cervical/axilar). Um paciente apresentou quadro clínico compatível com coriorretinite, que teve início por volta de 32 dias após a infecção e 20 dias após os sinais e sintomas iniciais e foi confirmada por meio de exame oftalmológico. Todos os pacientes apresentavam anticorpos específicos das classes IgG e IgM, o que permitiu que o diagnóstico de toxoplasmose aguda fosse estabelecido. Dos 17 pacientes, em 16 foi introduzida terapêutica específica, com a associação de sulfadiazina e pirimetamina, imediatamente após a confirmação do diagnóstico. A duração do tratamento foi de 40 dias e os pacientes tiveram boa evolução clínica e laboratorial. A paciente que estava no quinto mês de gestação recebeu esquema terapêutico constituído por espiramicina e sulfadiazina/pirimetamina, de maneira alternada, até o término da gravidez. Na

investigação da provável origem da infecção, foi realizado um estudo sorológico em 58 ovinos da propriedade de origem da carne consumida, o que correspondeu a 100% do rebanho. Títulos maiores ou iguais a 1:64 foram detectados em 24 animais, o que sugeriu que animais desta propriedade provavelmente estavam envolvidos no surto.

3.2 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose adquiriu grande importância, inicialmente, com a descoberta de sua influência em indivíduos imunocomprometidos, principalmente portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV (LUFT e REMINGTON, 1992). Esta protozoonose, por acometer animais e pelas graves sequelas advindas da infecção no homem, é cada vez mais estudada e diagnosticada em todo o mundo (DIAS et al., 2005).

3.2.1 Toxoplasmose em Campos dos Goytacazes

Diversos estudos foram realizados na cidade de Campos dos Goytacazes com o intuito de investigar as principais fontes de infecção por *T. gondii* neste município. Bahia-Oliveira et al. (2003), por meio de pesquisas soroepidemiológicas, indicaram a ingestão de água por fontes não tratadas, principalmente por indivíduos de baixa e média renda, como um dos principais fatores associados à soropositividade humana. Silva et al. (2003a), por sua vez, isolaram *T. gondii* de corações e cérebros de galinhas criadas de forma extensiva e Dubey et al. (2003) realizaram a caracterização genética destes isolados. Frazão-Teixeira et al. (2011) encontraram cinco isolados de *T. gondii* (TgPgBr1-5) de corações e cérebros de suínos vendidos a fresco no mercado municipal da cidade e também identificaram quatro genótipos. Este estudo foi o primeiro a relatar o sequenciamento de isolados de *T. gondii* de suínos no Brasil e demonstrou uma elevada ocorrência de alelos

atípicos. Também em suínos, Jiménez-Sanz (2011; dados ainda não publicados) isolou três cepas deste protozoário a partir de carnes comercializadas em açougues. Frazão-Teixeira e Oliveira (2011) observaram a extensa distribuição do parasito na região por meio de testes sorológicos em bovinos e suínos, com soropositividades de 49,4% e 11,5%, respectivamente. Cabe ressaltar que, apesar dos bovinos apresentarem anticorpos anti-*T. gondii*, a ingestão da carne desta espécie não é considerada importante na epidemiologia de *T. gondii*, uma vez que estes animais não são bons hospedeiros para este parasito. No entanto, não se pode ter a certeza de que a carne bovina não possui um papel na transmissão uma vez que, até o momento, um pequeno número de amostras foi testado para a presença de parasitos viáveis de *T. gondii* (DUBEY, 2010). Por fim, Cosendey-KezenLeite et al. (2014) demonstraram a alta prevalência de *T. gondii* em ovinos no município de Campos dos Goytacazes, com taxas de 43,57%.

3.2.2 Toxoplasmose em ovinos

3.2.2.1 Fatores de risco relacionados à soroprevalência

Levantamentos acerca dos fatores de risco associados à soropositividade para *T. gondii* em ovinos já foram realizados em várias regiões pelo mundo, como África do Sul (SAMRA et al., 2007), México (CABALLERO-ORTEGA et al., 2008), Sérvia (KLUN et al., 2006), Noruega (SKJERVE et al., 1998), Itália (VESCO et al., 2007), Portugal (LOPES et al., 2013), Irã (BAHRIENI et al., 2008), Grécia (TZANIDAKIS et al., 2012), Gana (VAN DER PUIJE et al., 2000) e China (WANG et al., 2011). No Brasil, estudos já foram conduzidos no Rio Grande do Norte (CLEMENTINO et al., 2007; SOARES et al., 2009), Bahia (GUIMARÃES et al., 2013), Minas Gerais (CARNEIRO et al., 2009), São Paulo (FIGLIUOLO et al., 2004), Sergipe (MENDONÇA et al., 2013), Maranhão (MORAES et al., 2011), Pernambuco (PEREIRA et al., 2012; SILVA et al.; 2003b; TEMBUE et al., 2009), Alagoas (PINHEIRO JÚNIOR et al., 2009), Paraná (ROMANELLI et al., 2007), Santa Catarina

(SAKATA et al., 2012) e Rio de Janeiro (COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014; LUCIANO et al., 2011). Um grande número de variáveis pode estar associado à presença de anticorpos anti-*T. gondii* em rebanhos ovinos, sendo que há certa discordância em algumas pesquisas a respeito de alguns deles.

Os fatores de risco estudados até o momento estão relacionados ao sexo (CLEMENTINO et al., 2007; COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014; LOPES et al., 2010; LUCIANO et al., 2011; RAGOZO et al., 2008; SILVA et al., 2003b; UENO et al., 2009; VAN DER PUIJE et al., 2000), idade (BAHRIENI et al., 2008; CABALLERO-ORTEGA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2009; CLEMENTINO et al., 2007; COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014; FIGLIUOLO et al., 2004; LOPES et al., 2013; LUCIANO et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013; PINHEIRO JÚNIOR et al., 2009; ROMANELLI et al., 2007; TEMBUE et al., 2009; VAN DER PUIJE et al., 2000; VESCO et al., 2007), presença de roedores (OGAWA et al., 2003; ROMANELLI et al., 2007) e gatos (LOPES et al., 2010; MENDONÇA et al., 2013; PINHEIRO JÚNIOR et al., 2009; ROMANELLI et al., 2007; VESCO et al., 2007), sistemas de criação (COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014; LOPES et al., 2010; LUCIANO et al., 2011; PINHEIRO JÚNIOR et al., 2009; VAN DER PUIJE et al., 2000; ROMANELLI et al., 2007; SAMRA et al., 2007; TZANIDAKIS et al., 2012; WANG et al., 2011), fontes de água (COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014; LUCIANO et al., 2011; MENDONÇA et al., 2013; PINHEIRO JÚNIOR et al., 2009; ROMANELLI et al., 2007; VESCO et al., 2007), assistência veterinária (COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014), tamanho do rebanho (CABALLERO-ORTEGA et al., 2008; VESCO et al., 2007), raça (ROMANELLI et al., 2007; SAKATA et al., 2012; VAN DER PUIJE et al., 2000) e espécie (BAHRIENI et al., 2008; TZANIDAKIS et al., 2012; VAN DER PUIJE et al., 2000; WANG et al., 2011).

3.2.2.2 Soroprevalência

Anticorpos anti-*T. gondii* são encontrados em ovinos por todo o mundo (Quadro 1), inclusive no Brasil (Quadro 2). As pesquisas que apontam as prevalências sorológicas não devem, no entanto, ser estritamente comparadas. Isso

porque os dados obtidos em diferentes levantamentos utilizam testes sorológicos e pontos de corte distintos na determinação da soropositividade. A data de amostragem também influencia nos resultados, isto é, a soroprevalência de pesquisas realizadas atualmente provavelmente irá diferir daquelas realizadas há algumas décadas (DUBEY, 2010).

Para o diagnóstico sorológico, diversos testes foram desenvolvidos nas últimas décadas. Alguns trabalhos demonstraram os diferentes resultados que foram obtidos a partir da utilização de testes sorológicos distintos. Shaapan et al. (2008) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar a sensibilidade e a especificidade de diferentes testes sorológicos na detecção da infecção por *T. gondii* em ovinos naturalmente infectados. Foram comparados os seguintes testes: IFAT, ELISA, MAT e DT. Os resultados demonstraram os benefícios do uso do MAT, um teste mais sensível e um pouco mais específico para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soro de ovinos.

Quadro 1. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos no mundo nos últimos cinco anos.

PAÍSES	FREQUÊNCIA			AUTORES
	n ^a	%	Teste	
Bangladesh	25	40	LAT ^b	Shaiduzzaman et al.(2011)
China	792	3,0	IHA ^c	Wang et al.(2011)
	566	4,4	IHA	Yang et al. (2013)
Egito	62	98,4	ELISA ^d	Ghoneim et al. (2010)
	62	67,7	PCR ^e	
Espanha	177	57	DAT ^f	Panadero et al. (2010)
Finlândia	1940	24,6	DAT	Jokelainen et al. (2010)
Grécia	1501	48,6	ELISA	Tzanidakis et al. (2012)
Holanda	1179	27,8	ELISA	Opsteegh et al. (2010)
Irã	186	24,8	ELISA	Moazeni Jula et al. (2013)
	95	17,9	PCR	Khamesipour et al. (2014)
Irlanda	292	36	LAT	Halová et al. (2013)
Japão	267	28,8	IFAT ^g	Gianguaspero et al. (2013)
México	511	15,1	MAT ^h	Alvarado-Esquivel et al. (2011)
Portugal	119	33,6	MAT	Lopes et al. (2013)
Turquia	186	98,9	DT ⁱ	Çiçek et al. (2011)

^aNúmero de amostras testadas.

^bLatex Agglutination Test (Teste de Aglutinação em Látex).

^cIndirect Haemagglutination Test (Teste de Hemoaglutinação Indireta).

^dEnzyme-linked Immunosorbent Assay (Reação Imunoenzimática).

^ePolymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase).

^fDirect Agglutination Test (Teste de Aglutinação Direta).

^gImmunofluorescence Antibody Test (Reação de Imunofluorescência Indireta).

^hModified Agglutination Test (Teste de Aglutinação Modificado).

ⁱDye Test (Sabin-Feldman Test).

Quadro 2. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos no Brasil (adaptado de Dubey et al., 2012).

ESTADO	FREQUÊNCIA			AUTORES
	n ^a	%	Teste	
Alagoas	432	32,9	IFAT ^b	Pinheiro-Júnior et al.(2009)
Bahia	240	18,7	LAT ^c	Gondim et al.(1999)
	795	30,2	IFAT	Guimarães et al. (2013)
Bahia e Rio Grande do Sul	100	23	IHA ^d	Do Amaral et al. (1978)
Distrito Federal	1028	38,2	IFAT	Ueno et al. (2009)
Espírito Santo	236	38,5	IHA	Tesolini et al. (2012)
Maranhão	64	18,8	IFAT	Moraes et al. (2011)
Minas Gerais	155	46,5	IFAT	Rossi et al. (2011)
	250	57,6	IFAT	Bassi et al. (2013)
	711	43,2	IFAT	Carneiro et al. (2009)
Paraná	167	25,7	ELISA ^e	Socol et al. (2009)
	157	7	IFAT	De Moura et al. (2007)
	305	51,5	IFAT	Romanelli et al. (2007)
	228	51,8	IFAT	Garcia et al. (1999)
	370	47,8	IFAT	Freire et al. (1995)
	339	54,6	IFAT	Ogawa et al. (2003)
Pernambuco	173	35,3	IFAT	Silva et al. (2003c)
	124	48,4	IFAT	Bispo et al. (2011)
	97	60,8	IFAT	Costa et al. (2012)
	95	16,9	IFAT	Pereira et al. (2012)
	81	49,4	IFAT	Tembue et al. (2009)
Rio de Janeiro	360	38,1	IFAT	Luciano et al. (2011)
	379	53,3	MAT ^f	Cosendey-KezenLeite et al. (2014)
Rio Grande do Norte	102	29,4	ELISA	Clementino et al. (2007)
	409	20,7	IFAT	Soares et al. (2009)
	903	22,1	ELISA	Andrade et al. (2013)
Rio Grande do Sul e Santa Catarina	522	7,7	IFAT	Silva e Langoni (2001)
	218	12,8	IFAT	Silva et al. (1981)
Rio Grande do Sul	144	30,5	LAT	Martins et al. (1998)
	123	39	IFAT	Silva e de La Rue (2006)
	92	21,1	IHA	Silva et al. (1980)
	92	9,8	IFAT	
	100	39	DT ^g	Larsson et al. (1980)
	662	18,2	IHA	Zonta et al. (1987)
	665	8	LAT	Nishikawa et al. (1984)
Rondônia	141	46,8	IFAT	Cavalcante et al. (2004)
Santa Catarina	360	56,9	IFAT	Sakata et al. (2012)
	360	42,5	ELISA	
São Paulo	100	8	IFAT	Silva et al. (2002)
	100	11	MAT	
	602	10,9	IFAT	Silva et al. (2011)
	597	34,7	IFAT	Figliuolo et al. (2004)
	488	52	IFAT	Lopes et al. (2010)
	200	31	ELISA	Meireles et al. (2003)
	522	7,7	IFAT	Silva e Langoni (2001)
	177	22,5	IFAT	De Oliveira-Sequeira et al. (1993)
	495	24,2	MAT	Ragozo et al. (2008)
	382	18,6	MAT	Langoni et al. (2011)
382	18,6	IFAT		
Sergipe	932	28,2	IFAT	Mendonça et al. (2013)

^aNúmero de amostras testadas.

^bImmunofluorescence Antibody Test (Reação de Imunofluorescência Indireta).

^cLatex Agglutination Test (Teste de Aglutinação em Látex).

^dIndirect Haemagglutination Test (Teste de Hemoaglutinação Indireta).

^eEnzyme-linked Immunosorbent Assay (Reação Imunoenzimática).

^fModified Agglutination Test (Teste de Aglutinação Modificado).

^gDye Test (Sabin-Feldman Test).

3.2.2.3 Isolamento

Toxoplasma gondii viáveis são isolados de ovinos naturalmente infectados no Brasil (Quadro 3) e no mundo (Quadro 4). No entanto, os dados ainda são escassos. Nesta espécie, há relatos de isolamento deste parasito em tecidos como o cérebro, pulmão, coração e diafragma e apenas em algumas pesquisas foram realizadas as genotipagens destes isolados.

O primeiro relato de isolamento de *T. gondii* de ovinos no Brasil foi feito por Spósito Filha et al. (1992), de animais abatidos em matadouros do estado de São Paulo e procedentes do Rio Grande do Sul. Nesta pesquisa, foram obtidos 20 isolados de 136 diafragmas. No entanto, a identificação de apenas cinco destes foi baseada na observação de cistos teciduais em esfregaços de cérebros de camundongos inoculados com produto da digestão péptica dos diafragmas de ovinos. Destes cinco isolados, três foram reconhecidos na primeira passagem em camundongos; um na segunda passagem e, por fim, outro na quinta passagem. Nos 15 isolados excedentes, não se pode afirmar que os parasitos encontrados eram *T. gondii*, uma vez que os cistos teciduais foram identificados apenas em secções dos cérebros dos camundongos coradas por hematoxilina e eosina, após a quinta passagem, sem a observação do parasito vivo.

Em São Paulo, *T. gondii* foi isolado do cérebro e diafragma de 34 de 40 ovinos soropositivos. Estes animais eram provenientes de fazendas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SILVA e LANGONI, 2001). Cabe ressaltar que a identificação de *T. gondii* deve sempre ser confirmada pela passagem do parasito a novos camundongos (DUBEY et al., 2012) e, neste trabalho, uma considerável parcela dos resultados foi baseada em achados de anticorpos anti-*T. gondii* no soro dos camundongos utilizados na prova biológica. Em apenas 12 ovinos foram observados cistos teciduais em esfregaços de cérebros dos camundongos e a identificação dos mesmos foi confirmada em apenas quatro achados em esfregaços de cérebro corados por Giemsa.

Ragozo et al. (2008) encontraram 16 isolados (TgShBr1-16) em 82 ovinos soropositivos por meio de prova biológica e, posteriormente, Ragozo et al. (2010) realizaram a genotipagem dos mesmos pela técnica de multi-locus PCR-RFLP. Por

fim, o estudo mais recente no Brasil foi realizado por Silva et al. (2011), em que 11% (66 de 602) dos ovinos abatidos no estado de São Paulo (oriundos desse mesmo estado e também do Rio Grande do Sul) soroconverteram. Vinte isolados foram obtidos dos 66 animais que apresentavam anticorpos anti-*T. gondii* por meio de prova biológica em camundongos: 15 de animais originários do estado do Rio Grande do Sul (TgOvBr1-4, 6-8, 10, 15, 18, 20 de Santana do Livramento, TgOvBr5, 9, 13, 14 de Uruguaiana) e cinco do estado de São Paulo (TgOvBr11, 16 de Ourinhos, TgOvBr12, 19 de Pirajuí, TgOvBr17 de Manduri) (Dubey et al., 2012).

Quadro 3. Isolamento de *Toxoplasma gondii* viáveis de tecidos de ovinos naturalmente infectados no Brasil.

ESTADO	FREQUENCIA		DESIGNAÇÃO	GENOTIPAGEM	AMOSTRA	AUTORES
	N	%				
Rio Grande do Sul	136	3,6 ^b	—	—	Diafragma	Spósito Filha et al. (1992)
Rio Grande do Sul; Santa Catarina	40 ^a	85	—	—	Cérebro, diafragma	Silva e Langoni (2001)
São Paulo	82 ^a	19,5	TgShBr1-16	Sim	Cérebro, diafragma e coração	Ragozo et al. (2008)
Rio Grande do Sul; São Paulo	66 ^a	30,3	TgOvBr1-20	Sim	Cérebro, pulmão, diafragma e coração	Silva et. al. (2011)

^aSoropositivos.

^bAutores afirmam que encontraram cistos teciduais adicionais em secções coradas pela hematoxilina e eosina de camundongos inoculados com cérebros de 15 ovelhas.

Na literatura mundial, foram encontradas quatro pesquisas em que foram realizados isolamentos de *T. gondii* de ovinos naturalmente infectados (Quadro 4). Na França, Dumètre et al. (2006) isolaram o parasito de oito (Fr2-2005-*Ovi ar1*-6, Fr2-2006 *Ovi ar1*-2) de 30 corações de ovinos soropositivos submetidos à prova biológica em camundongos, sendo todos caracterizados geneticamente. No Irã, foram obtidos quatro isolados de cérebro de 105 animais soropositivos através de prova biológica em camundongos e estes foram caracterizados geneticamente (ZIA-ALI et al., 2007). Dubey et al. (2008a), utilizaram corações oriundos de 68 cordeiros sororreativos, após a realização do MAT em 383 animais desta espécie nos EUA, com a finalidade de isolar *T. gondii* viável através de prova biológica em gatos, camundongos ou ambos. Foram obtidos 53 isolados (TgShUs1-53) no total e estes foram genotipados. O último trabalho de isolamento deste parasito em ovinos no mundo foi feito por Halos et al. (2010) na França. Nele, 397 corações submetidos a prova biológica em camundongos resultaram em 48 isolados posteriormente genotipados.

Quadro 4. Isolamento de *Toxoplasma gondii* viáveis de tecidos de ovinos naturalmente infectados no mundo.

PAÍS	FREQUÊNCIA		DESIGNAÇÃO	GENOTIPAGEM	AMOSTRA	AUTORES
	n	%				
Estados Unidos	68 ^a	77,9	TgShUs1-53	Sim	Coração	Dubey et al. (2008a)
França	30 ^a	26,6	Fr2-2005- <i>Ovi ari1</i> -6, Fr2-2006- <i>Ovi ari1</i> -2	Sim	Coração	Dumètre et al. (2006)
	397	12	—	Sim	Coração	Halos et al. (2010)
Irã	105 ^a	3,8	—	Sim	Cérebro	Zia-Ali et al. (2007)

^aSoropositivos.

3.2.2.4 Caracterização genética

Poucas tipagens genéticas vêm sendo realizadas em isolados de *T. gondii* de ovinos pelo mundo. No entanto, a maioria dos dados publicados indica que o genótipo tipo II é a linhagem predominante das cepas isoladas de ovinos, seguido do genótipo tipo III (DUBEY, 2010). O genótipo clonal tipo II é a cepa de *T. gondii* mais prevalente infectando humanos na América do Norte e Europa (AJZENBERG et al., 2002; HOWE E SIBLEY, 1995). Desta forma, esses animais podem ser uma importante fonte de infecção por *T. gondii* (RAGOZO et al., 2010). Até hoje, nenhum isolado de *T. gondii* do tipo I foi encontrando em ovinos.

A multi-locus PCR-RFLP foi desenvolvida com um grupo de marcadores moleculares capazes de distinguir as três linhagens clonais de *T. gondii* (tipos I, II e III) após tratamento dos produtos de amplificação (produtos da PCR) com uma ou duas enzimas de restrição. Os marcadores utilizados por Su et al. (2006), capazes de alta resolução para caracterização genética de isolados de *T. gondii* são: SAG2, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, Apico, PK1, L358 e GRA6. Mais recentemente, o marcador SAG1 foi introduzido à análise, constituindo hoje 10 marcadores genéticos (DUBEY et al., 2008b). A caracterização genética dos isolados é então realizada por meio da comparação dos fragmentos de restrição obtidos após a digestão dos produtos de amplificação de DNA do parasito para cada *locus* (ou marcador) com isolados referência sabidamente tipos I, II e III (FRAZÃO-TEIXEIRA, 2009).

Entretanto, apesar da fácil aplicação da técnica de multi-locus PCR-RFLP, esta é insuficiente para caracterizar isolados do parasito obtidos de tecidos animais do Brasil. Isto ocorre porque a técnica foi inicialmente desenvolvida para diferenciar as três linhagens presentes em países da América do Norte, Europa e África (genótipos I, II e III). No Brasil, a elevada diversidade genética existente somente pode ser observada através da técnica de “multi-locus DNA sequencing”, visto que detecta diferenças genéticas nucleotídeo a nucleotídeo (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011).

Resultados significativos de caracterização genética de *T. gondii* em ovinos por meio da multi-locus PCR-RFLP já foram publicados em alguns países. No Brasil, dados de genotipagem nesta espécie foram obtidos por dois grupos de pesquisa.

Em São Paulo, Ragozo et al. (2010), através da multi-locus PCR-RFLP, utilizando 11 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3), encontraram sete genótipos de 16 isolados. Quatro isolados foram agrupados na linhagem clonal comum tipo BrI; um na linhagem clonal tipo BrIII; três foram semelhantes à cepa referência TgCatBr64 e oito foram revelados pela primeira vez no Brasil. Vale ressaltar que quatro genótipos detectados pela multi-locus PCR-RFLP têm sido considerados as linhagens clonais comuns no Brasil, designadas como tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA et al., 2008).

Silva et al. (2011), tipificaram amostras positivas pela mesma técnica e também pelo uso de 11 marcadores: SAG1, SAG2 (5'+3' SAG2 e Alt-SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-6, PK1, Apico e CS3. Foram identificados nove genótipos: três isolados foram idênticos à cepa referência MAS; três idênticos a outras três cepas referência (TgCatBr1, TgCatBr5 e TgCaBr64) e, finalmente, os outros cinco isolados restantes foram divididos em quatro genótipos atípicos, os quais não haviam sido reportados anteriormente. É importante ressaltar que oito dessas cepas apresentaram o alelo tipo II. Este foi o primeiro estudo a confirmar a existência desta cepa clonal no Brasil. Os dois ovinos dos quais foram obtidos o genótipo tipo II apresentaram titulações elevadas na sorologia (MAT: 1024; IFAT-IgG: 64) e uma média de 480 cistos por cérebro na prova biológica em camundongos a partir de tecido muscular ou cerebral de ovinos. Ambos os ovinos eram fêmeas de dois anos de idade, da raça Powarth (Ideal), originária da Austrália e Nova Zelândia e extensivamente criada em Santana do Livramento e Uruguaiana, no estado do Rio Grande do Sul, onde fazem fronteira com Uruguai e Argentina. Cabe salientar que os locais de origem desta raça apresentam elevada prevalência de cepas tipo II tanto em humanos quanto animais.

Nos EUA, Dubey et al. (2008a), Dubey e Su (2009) e Edwards e Dubey (2013) utilizaram a multi-locus PCR-RFLP para a genotipagem de isolados de *T. gondii* em ovinos. Na primeira análise genética profunda desta espécie no referido país foram encontrados 15 genótipos oriundos de 53 isolados por meio da utilização de 10 marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico). Quatro cordeiros tiveram infecção com dois genótipos de *T. gondii*. Vinte e seis cepas (45,6%) pertenciam à linhagem clonal tipo II, que foi a predominante; oito (15,7%) pertenciam à linhagem clonal tipo III e as 22 remanescentes foram divididas

em 11 genótipos atípicos (DUBEY et al., 2008a). Em um segundo trabalho, a partir de 53 isolados, quatro foram classificados como genótipos mistos utilizando 10 marcadores moleculares multi-locus PCR-RFLP: SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico (DUBEY e SU, 2009). Por fim, Edwards e Dubey (2013), a partir de isolados de *T. gondii* de cérebro e coração de um cordeiro abortado de uma ovelha cronicamente infectada, realizaram a multi-locus PCR-RFLP com 10 marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico), observaram que os dois isolados tinham genótipos idênticos, atípicos e virulentos a 100% dos camundongos inoculados na prova biológica, independente da dose ou do estágio do parasito inoculado.

Dumètre et al. (2006), na França, classificaram oito isolados obtidos de 30 corações de ovinos provenientes de um matadouro como do tipo II pela caracterização genética, utilizando SAG2 e cinco marcadores microssatélites (TUB2, TgM-A, W35, B17, B18). Já Halos et al. (2010), utilizaram corações provenientes de cordeiros da França para a realização da caracterização genética com os marcadores SAG1, SAG2, GRA7 e seis marcadores microssatélites em um ensaio multiplex associando TUB2, W35, tgM-A, B18, B17 e M33, e encontraram o seguinte resultado: 47 isolados pertenciam ao genótipo tipo II e um ao genótipo tipo III. O genótipo tipo II é o mais frequentemente identificado na França, assim como em humanos e animais em toda a Europa. Vale ressaltar que o genótipo tipo III é raro na França, mas parece ser mais frequente em Portugal e na Espanha (DE SOUZA et al., 2006); este cordeiro era oriundo da fronteira espanhola.

Zia-Ali et al. (2007) relataram que, de quatro isolados de *T. gondii* de ovinos adultos no Irã, dois eram do tipo II e dois do tipo III, através da multiplex PCR para cinco marcadores microssatélites (TUB2, TgM-A, W35, B17, B18) e análise da sequência do gene GRA6. Owen e Trees (1999) isolaram e amplificaram o DNA diretamente das placentas de 13 ovelhas abortadas provenientes de 10 fazendas amplamente separadas no Reino Unido e dois isolados dos corações de cordeiros de um local não definido e estes eram todos do tipo II, baseado no *locus* SAG2. Na Dinamarca, Jungersen et al. (2002) relataram que 11 isolados (seis de cordeiros abortados, cinco de ovelhas saudáveis) eram também do tipo II. Os resultados do Reino Unido e da Dinamarca são interessantes por demonstrarem que não há diferença no genótipo baseado no estado de saúde (abortamento) dos animais. Na

Suíça, diafragmas de 250 ovinos (100 cordeiros e 150 adultos) foram investigados por mutli-locus PCR-RFLP para nove marcadores (SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico) e os resultados demonstraram que *T. gondii* com alelos clonais do tipo II foram predominantemente observados, enquanto combinações mistas ou de alelos atípicos foram extremamente raras (BERGER-SCHOCH et al., 2011). Chessa et al. (2014), em genotipagem de isolados de fetos abortados na Itália, realizada com 11 marcadores multi-locus PCR-RFLP, encontraram DNA de *T. gondii* em cinco placentas, 14 cérebros e dois fígados, os quais pertenciam ao tipo II em todos os 11 *loci* para todos os 10 marcadores (SAG1, SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico). Finalmente, um ensaio multiplex PCR com 15 marcadores microssatélites foi empregado em 18 isolados obtidos de corações de ovinos e 16 demonstraram pertencer ao tipo II, um ao tipo III e um foi atípico. Este foi o primeiro relato de isolamento e genotipagem de *T. gondii* em ovinos na Etiópia (GEBREMEDHIN et al., 2014).

3.3 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

Ainda não há um medicamento eficaz no tratamento da toxoplasmose na fase crônica da infecção. As drogas utilizadas, como pirimetamina e sulfonamidas, atuam contra taquizoítos, mas não contra bradizoítos em cistos teciduais. Como a maioria das pessoas com sorologia positiva não apresenta a doença e pelo fato das drogas empregadas poderem se tornar tóxicas com o uso prolongado, recomenda-se o tratamento apenas dos casos agudos, da toxoplasmose ocular e dos indivíduos imunodeficientes (KAWAZOE, 2010).

Na prevenção da infecção de seres humanos por *T. gondii*, as mãos devem ser lavadas por completo com sabão e água após o manuseio de carnes. Todo o material que entrar em contato com carne crua deve ser higienizado da mesma forma anteriormente citada (DUBEY, 2010). A carne de qualquer animal destinada ao consumo humano ou animal deve ser cozida até que atinja uma temperatura interna de 66°C (DUBEY et al., 1990). O uso de microondas, no entanto, é ineficiente na eliminação de *T. gondii* (EL-NAWAWI et al., 2008). Os cistos teciduais

são efetivamente eliminados em carnes congeladas a -12°C por 12 horas (KOTULA et al., 1991) e a irradiação a 50 krads é capaz de eliminar cistos teciduais (DUBEY et al., 1986; DUBEY e THAYER, 1994), assim como oocistos (DUBEY et al., 1996). As verduras também devem ser corretamente lavadas antes do consumo, uma vez que podem estar contaminadas com fezes de gatos (DUBEY, 2010).

As mulheres gestantes devem evitar contato com solo e o manuseio e ingestão de carne crua. Os gatos domésticos devem ser alimentados apenas com comidas secas, enlatadas ou cozidas. As caixas de areia dos animais devem ser limpas todos os dias como forma de prevenção da esporulação dos oocistos (DUBEY, 2010).

Para prevenir a infecção em gatos, estes não devem ser alimentados com carne mal passada, ossos ou vísceras e esforços devem ser feitos na tentativa de manter os animais dentro de casa, evitando-se assim o hábito da caça. O controle de roedores também deve ser realizado (KAWAZOE, 2010).

No caso específico de ovinos, aqueles que abortaram devido à toxoplasmose usualmente não desenvolvem abortamentos recorrentes pela mesma causa. Sendo assim, podem ser utilizados em cruzamentos futuros. As membranas fetais e os fetos abortados não devem ser manipulados com as mãos sem proteção e devem ser incinerados ou queimados como forma de prevenir a infecção de felídeos e de outros animais da propriedade (DUBEY, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa se constituiu de duas etapas:

- Aplicação de técnicas para isolamento de *T. gondii* da carne ovina comercializada em açougues e por vendedores de churrasco em espeto nos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana;
- Aplicação de testes para detecção de *T. gondii* em tecidos oriundos de ovinos sorologicamente positivos no município de Campos dos Goytacazes;

O processamento do material foi realizado no NUPAP/LSA/CCTA/UENF e no Laboratório Sonda - IBqM/UFRJ.

4.2 LEVANTAMENTO DOS AÇOUGUES

Na primeira etapa desta pesquisa foi feito um levantamento de dois tipos de estabelecimentos de venda de carne ovina *in natura* no município de Campos dos Goytacazes (Quadro 5): açougues e vendedores de churrasco em espeto. Foram coletadas 31 amostras de carne ovina crua, sendo 20 de açougues (14 congeladas e seis resfriadas) e 11 nos demais estabelecimentos (uma congelada e 10 refrigeradas). Os cortes cárneos adquiridos ficaram condicionados à disponibilidade nos estabelecimentos. As amostras pesavam, aproximadamente, 500g cada e foram

adquiridas por meio de simulação de compra por um consumidor regular. As carnes foram processadas em até duas horas após a coleta e submetidas à prova biológica.

Quadro 5. Amostras de carne ovina adquiridas em açougues e com vendedores de churrasco em espeto nos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana, RJ.

Cidade/distrito	N ¹	Método de conservação		Tipo de estabelecimento
		Resfriada	Congelada	
Campos dos Goytacazes				
Tócos	1	X		Açougue
Centro	11		x	Açougue
	5	X		Açougue
	10	X		Outros ²
	1		x	Outros
Santo Eduardo	1		x	Açougue
São Francisco de Itabapoana				
Centro	1		x	Açougue
Praça João Pessoa	1		x	Açougue
TOTAL	31	16	15	

¹Número de amostras.

²Vendedores de churrasco em espeto.

4.3 SELEÇÃO DOS OVINOS

Os animais utilizados neste estudo eram provenientes de uma propriedade de criação comercial localizada no município de Campos dos Goytacazes, RJ e, desta, foram selecionados, por conveniência (PEREIRA, 1995), 50 ovinos, dos quais o sangue foi coletado por punção da veia jugular, após anti-sepsia local com solução de álcool iodado a 2%, utilizando-se para tal fim agulhas descartáveis de dimensões 40x12 mm (Nipro[®]). O sangue foi armazenado em tubos do tipo “Vacutainer” de vidro sem anticoagulante (Vacuplast[®]), identificados e mantidos em refrigeração (4°C), no NUPAP, até seu processamento.

O sangue foi centrifugado a 350g, por 10 minutos (Centrífuga Novatécnica[®], NT 815, Brasil), para a obtenção do soro e este foi acondicionado em tubos plásticos de 2,0 mL, identificados e armazenados sob a temperatura de -20 °C até o momento da realização do teste sorológico.

4.4 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA

Foi utilizada a técnica de MAT para a análise dos soros dos ovinos e este foi realizado em microplacas de 96 poços em forma de “U” (Greiner Bio-one®). Os soros a serem testados foram diluídos em PBS 0,01M (pH 7,2). A técnica foi realizada de acordo com o protocolo preconizado por Dubey e Desmonts (1987), da seguinte forma: a suspensão de antígeno foi preparada utilizando-se 2,5 mL de solução de uso de tampão borato pH 8,9, 35 µL de 2-mercaptoetanol, 50 µL de azul de Evans a 2 mg/mL e 100 µL da suspensão de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH inativados com formalina, gentilmente cedida pelo Dr. Jitender Dubey do APDL/USDA, EUA.

Em cada poço da placa foram adicionados 25 µL da solução de antígeno e 25 µL dos soros previamente diluídos a 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200. Controles positivos e negativos de camundongos previamente testados também foram incluídos. A placa foi coberta com filme plástico (Parafilm® Bemis, PM996) e incubada a 37°C por 12 horas. A leitura da reação se baseou no perfil de sedimentação da suspensão de taquizoítos, onde a formação de uma teia indica a presença de anticorpos e a formação de um ponto azul no fundo do poço indica a ausência destes.

4.5 AQUISIÇÃO DOS ANIMAIS

Foram adquiridos cinco ovinos com titulações de anticorpos anti-*T. gondii* igual ou superior a 1:3200, dos quais foram coletados cérebro, rim, fígado, baço, coração, língua e partes dos músculos diafragma, masseter e coxa que, por sua vez, foram acondicionados em recipientes individuais, identificados e transportados em caixas isotérmicas ao NUPAP para processamento imediato.

4.6 PROVA BIOLÓGICA

4.6.1 Digestão péptica das amostras

A aplicação da técnica de digestão péptica foi baseada em protocolo modificado por Frazão-Teixeira (2009) e previamente estabelecido por Dubey (1998b), assim como o preparo do inóculo. Esta metodologia foi aplicada tanto para as amostras de carnes adquiridas em açougues e outros estabelecimentos especializados quanto para os tecidos de ovinos naturalmente infectados.

Cada amostra foi triturada por inteiro, utilizando-se para isso um liquidificador laboratorial (Waring® Commercial Laboratory Blender). Foi feito um pool com a musculatura do diafragma, masseter e língua de cada animal, os quais constituíram uma amostra. Durante a trituração, foi adicionado um volume mínimo de PBS para facilitar o procedimento. O copo do aparelho era devidamente autoclavado (autoclave vertical 75 L, Phoenix Lufenco®, AV 75) entre as etapas para evitar contaminação entre as amostras. Foram então retirados 40g de cada homogeneizado, os quais foram acondicionados individualmente em Erlenmeyers de 200 mL previamente identificados. O recipiente era então completado com solução de pepsina ácida (pH entre 1,1 e 1,2) até o volume de 200 mL.

O processo de digestão foi feito com o uso de um agitador orbital termostatizado (Incubadora “shaker” Novatécnica®, NT 715), a 37°C durante uma hora. Após este período, o material digerido foi passado em tamis com gaze dupla e os filtrados distribuídos em quatro tubos falcon e então centrifugados (Centrífuga refrigerada, Novatécnica®, NT 815) a 1300 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado, do qual restava apenas uma fração de aproximadamente 5 mL no interior de cada tubo. O conteúdo era completado com solução neutralizadora (bicarbonato de sódio 1,2%, pH ajustado em 8,3) até atingir um volume final de 10 mL.

O conteúdo total de cada um dos quatro tubos foi reunido em um único tubo de 50 mL. Este foi centrifugado a 1300g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado e, então, adicionados 5-10 mL de solução de

antibiótica, preparada com a adição de 0,1g de antibiótico (Benzilpenicilina benzatina 3.000.000 UI, Benzilpenicilina procaína 1.500.000 UI, Benzilpenicilina potássica 1.500.000 UI, Sulfato de estreptomicina base 2.500 mg - Pencivet[®] plus) em 100 mL de água destilada. Deixou-se à temperatura ambiente por 30 minutos para que, então, fosse realizada a inoculação em camundongos.

4.6.2 Isolamento primário em camundongos

4.6.2.1 Eutanásia dos camundongos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UENF, sob a licença de número 108/2011 e o manuseio e procedimentos de eutanásia dos animais utilizados neste projeto seguiram os princípios éticos em pesquisa com animais de experimentação preconizados pelas resoluções normativas números 12 e 13, de 20 de setembro de 2013, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

4.6.2.2 Inoculação

Foram utilizados camundongos albinos suíços fêmeas, pesando entre 20 e 25g, oriundos do Biotério da UENF e do Instituto Vital Brazil. Uma dose de 1 mL da suspensão contendo o produto da digestão péptica foi inoculada, via subcutânea (s.c.), em cada camundongo, em grupos de cinco camundongos por amostra. Aos camundongos controle foi administrado apenas o veículo, PBS, pela mesma via.

4.6.2.3 Período de observação e isolamento

Cada grupo de cinco camundongos inoculados, referente a um tecido analisado, foi mantido em uma caixa devidamente identificada no Biotério da UENF e recebeu ração própria para a espécie e água *ad libitum*. Os animais foram observados durante seis semanas. Os que vieram a óbito ou apresentaram qualquer sinal que sugerisse infecção por *T. gondii* (como letargia, pêlos eriçados e olhos entreabertos), foram examinados para eventual presença do parasito em esfregaço de pulmões em lâminas, através da observação ao microscópio óptico (Zeiss®), para a busca de taquizoítos, em objetiva de 40X. Quando foram observados taquizoítos, a amostra foi considerada positiva. Uma amostra de tecido pulmonar dos animais infectados de aproximadamente 1 a 3mm foi acondicionada em mini tubo plástico com tampa do tipo “ependorf” de 1,5 mL, devidamente identificada e acondicionada a -20°C para futura análise de DNA do parasito.

Os camundongos que não apresentaram quaisquer sinais de infecção por *T. gondii* ao final do período de observação foram testados para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* através do MAT. Os soropositivos foram eutanasiados e esfregaços de seus cérebros observados diretamente ao microscópio óptico para a visualização de cistos em objetiva de 10X.

4.6.2.3.1 **Técnica de preparo de esfregaço de pulmão em lâminas**

Com o auxílio de uma pinça, um fragmento de aproximadamente 50 mm do pulmão foi comprimido sobre uma lâmina de microscopia comum com a finalidade de liberar fluido e células. Uma gota de solução salina (NaCl 0,9%) foi adicionada ao esfregaço e homogeneizada com o próprio tecido. Por fim, uma lamínula foi colocada sobre o esfregaço e feita a observação em microscópio óptico em objetiva de 40X, em busca de taquizoítos.

4.6.2.3.2 *Técnica para observação direta de cisto cerebral*

A técnica consistiu em colocar um fragmento do tecido entre duas lâminas e, em seguida, arrastar uma sobre a outra, formando-se, então, uma fina camada de tecido. A observação foi feita em microscópio óptico em objetiva de 10X.

4.7 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

A caracterização genética foi realizada no Laboratório Sonda - IBqM/UFRJ, utilizando a técnica “muti-locus DNA sequencing” (sequenciamento), com a comparação dos nucleotídeos dos fragmentos de DNA sequenciados, como descrito a seguir.

4.7.1 **Extração de DNA**

Para a extração de DNA de amostras de tecidos ovinos e de amostras de pulmões e cérebros de camundongos infectados utilizou-se o kit DNeasy[®] da Qiagen, de acordo com o protocolo do fabricante e com modificações preconizadas por Frazão-Teixeira (2009).

Os reagentes utilizados para o protocolo spin-column para tecidos animais foram disponibilizados pelo fabricante. Acondicionou-se o fragmento de 25 mg de tecido a ser analisado (carne, pulmão ou cérebro) em um tubo tipo “eppendorf” de 1,5 mL. Adicionaram-se 180 µL do tampão ATL e 20 µL de proteinase K, homogeneizou-se completamente em vortex (Biomixer[®], QL-901) e o material foi incubado em banho-maria (Novatécnica[®], NT248), a 56°C, até a completa lise do tecido, o que ocorreu em aproximadamente 3 horas.

Após a homogeneização dos tubos em vortex por 15 segundos, adicionaram-se 200 µL do tampão AL e estes foram novamente homogeneizados

em vortex. Em seguida, 200 µL de etanol 96 a 100% (não fornecido pelo fabricante) foram adicionados e repetiu-se o procedimento de homogeneização.

Transferiu-se a mistura (incluindo qualquer precipitado) para a coluna DNeasy mini spin, acoplada a um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se a 13.200 rpm (Eppendorf® miniSpin, AG 22331 Hamburg) por um minuto, seguido de descarte dos filtrados e tubos coletores. Colocaram-se as colunas DNeasy mini spin em novos tubos coletores, 500 µL de tampão AW1 foram adicionados e centrifugados a 13.200 rpm por um minuto. Filtrados e tubos coletores foram novamente descartados. Após a adição de novos tubos coletores às colunas DNeasy mini spin, adicionaram-se 500 µL de tampão AW2 e foram centrifugados a 13.200 rpm, por três minutos, com o objetivo de secar a membrana DNeasy®. Descartados os filtrados e tubos coletores, as colunas DNeasy mini spin foram acopladas a um tubo tipo “Eppendorf” de 1,5 ml (não fornecido pelo fabricante). Em seguida, adicionaram-se 50 µL de tampão AE (diluído 1:10 em água para PCR) diretamente à membrana DNeasy®. Incubou-se a solução, por um minuto, à temperatura ambiente, seguido de centrifugação, pelo mesmo intervalo de tempo, a 13.200 rpm, para eluição. Os mesmos 50 µL foram removidos e aplicados à mesma coluna novamente, ou seja, no mesmo tubo tipo “Eppendorf”.

O conteúdo foi incubado por um minuto à temperatura ambiente e centrifugado, pelo mesmo período, a 13.200 rpm, para eluição. Os tubos foram devidamente identificados e mantidos a -20°C até a realização da PCR.

4.7.2 Multi-locus DNA Sequencing

DNAs obtidos após extração dos tecidos de ovinos foram submetidos à amplificação de sequências nucleotídicas do elemento de repetição de 529pb de *T. gondii* (HOMAN et al., 2000) que permite a comprovação da existência ou não de DNA deste parasito.

Para genotipagem, o DNA dos isolados foi amplificado através de uma n-PCR para oito marcadores: SAG1, SAG3, BTUB, c22-8, Apico, PK1, L358 e GRA6. Os volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados para o

preparo das soluções mix para cada marcador molecular nas ampliações primária e secundária estão contidos no quadro 6.

Os iniciadores foram mantidos a -20°C na diluição de 500 pmol e somente diluídos a 50 pmol no momento da reação da PCR. As sequências dos iniciadores que foram utilizadas nas reações primárias e secundárias estão descritas no quadro 7. Para a reação primária, foram pipetados 47 μL da solução mix (Quadro 6) em microtubos de 0,2 mL e posteriormente adicionados 3 μL de cada amostra de DNA em cada um dos microtubos devidamente identificados, completando 50 μL de solução final. A enzima Taq DNA polimerase foi previamente mantida em recipiente com gelo e adicionada somente quando da adição das amostras. O programa da amplificação primária ao termociclador (Biometra[®], Tgradient) foi estabelecido como no quadro 8.

Para a reação de amplificação secundária (Quadro 6) o produto da reação primária foi utilizado no lugar da amostra de DNA original. Da mesma forma que na reação primária, as soluções mix foram preparadas separadamente para cada marcador. Foram então adicionados 49 μL destas soluções para cada microtubo de 0,2 mL. Em seguida foi adicionado 1 μL do produto da respectiva reação primária. Os microtubos foram devidamente identificados para cada marcador e isolado e, então, inseridos no termociclador para incubação de acordo com a mesma programação descrita para a reação de amplificação primária (Quadro 8).

Os produtos das n-PCRs das duas etapas do experimento foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 0,8% corado com GelRed[™] (Biotum[®]) e imerso em tampão TAE 1X em cuba horizontal (Bio-Rad[®], Power Pac[™] Basic) programado para 100 volts, 400 miliamperes, por 90 minutos. Para o preparo do gel de agarose, dissolveu-se 0,8g de agarose (Invitrogen[™]Ultrapure Agarose) em 100 mL de tampão TAE 1X (Ultrapure TAE buffer 10X Invitrogen[®]). Por fim, adicionaram-se 5 μL de GelRed[™].

Quadro 6. Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações primárias e secundárias de *nested*-PCRs de cada isolado de *Toxoplasma gondii*.

REAGENTE	AMPLIFICAÇÃO		ESPECIFICAÇÕES
	PRIMÁRIA	SECUNDÁRIA	
Tampão 10X (com MgCl ₂)	5 µL	5 µL	Sigma [®]
dNTPs (2 mM)	5 µL	5 µL	Sigma [®]
Iniciador Fb ^a (50 pmol)	0,5 µL	0,5 µL	IDT [®]
Iniciador Rb ^b (50 pmol)	0,5 µL	0,5 µL	IDT [®]
Taq polimerase (5 U/µL)	0,5 µL	0,5 µL	Sigma [®]
Amostra de DNA	3 µL ^c	1 µL ^d	–
Água para PCR	35,5 µL	37,5 µL	Sigma [®]
VOLUME FINAL	50 µL	50 µL	

^aIniciador direto para as amplificações primária e secundária.

^bIniciador reverso para as amplificações primária e secundária.

^cAmostra de DNA original.

^dProduto da amplificação primária.

Quadro 7. Descrição das sequências dos iniciadores utilizados para as amplificações primária e secundária de *nested-PCRs*.

Marcador		Iniciadores	Tamanho	Referência
SAG1	Externos	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	390 bp	Grigg et al. (2001)
	Internos	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCCGGTGTGAG		
SAG3	Externos	F:CAACTCTCACCATTCCACCC R:GCGCGTTGTTAGACAAGACA	225 bp	Grigg et al. (2001)
	Internos	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA		
BTUB	Externos	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	411 bp	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
	Internos	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC		
GRA6	Externos	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R:GCACCTTCGCTTGTGGTT	344 bp	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
	Internos	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG		
c22-8	Externos	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCGGTCTCA	521 bp	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
	Internos	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R:AGGTGCTTGGATATTCGC		
L358	Externos	F:TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R:GCAATTTCTCGAAGACAGG	418 bp	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
	Internos	F:AGGAGGCGTAGCGCAAGT R:CCCTCTGGCTGCAGTGCT		
PK1	Externos	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	903 bp	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
	Internos	F:CGCAAAGGGAGACAATCAGT R:TCATCGCTGAATCTCATTGC		
Apico	Externos	F:TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R:AACGGAATTAATGAGATTTGAA	640 bp	Su et al. (2006)
	Internos	F: GCAAATTCCTGAATTCTCAGTT R: GGGATTTCGAACCCTTGATA		

O programa das amplificações primária e secundária no termociclador está demonstrado no quadro 8.

Quadro 8. Programa para as ampliações primária e secundária de *nested*-PCRs realizadas em tecidos ovinos no município de Campos dos Goytacazes, RJ, para detecção de fragmentos de DNA de *Toxoplasma gondii*.

Número de ciclos	Temperatura	Período
1	94 °C	5 minutos
35	94 °C	40 segundos
	58 °C	40 segundos
	72 °C	90 segundos
1	72 °C	10 minutos
	4°C	∞

Os produtos da n-PCR foram purificados utilizando o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare®), de acordo com as especificações do fabricante. Primeiramente, 500 µL do tampão de captura tipo 3 foram adicionados ao produto da reação de PCR, vortexou-se exaustivamente e, em seguida, verificou-se se a coloração havia se tornado amarela ou laranja pálido, o que era desejado. Centrifugou-se rapidamente a mistura para coleta do líquido no fundo do tubo. Pipetou-se a mesma em uma coluna microspin acoplada a um tubo coletor de 2 mL (fornecido pelo fabricante). A coluna acoplada ao tubo foi centrifugada (MIKRO®200R, Hettich zentrifugen) a 16.000 g, durante 30 segundos, sendo o filtrado em seguida descartado e a coluna microspin alocada novamente no tubo coletor. Adicionaram-se 500 µl do tampão de lavagem tipo 1 à coluna microspin, seguido de centrifugação a 16.000 g por 30 segundos e descarte dos filtrados e tubo coletor. A coluna microspin foi transferida para um tubo tipo “eppendorf” livre de DNase de 1,5 mL (não fornecido pelo fabricante). Finalmente, 50 µL do tampão de eluição tipo 6 foram adicionados ao centro da membrana da coluna microspin. A solução foi incubada à temperatura ambiente, por um minuto e centrifugou-se a 16.000 g por mais um minuto para a recuperação do DNA purificado. Os tubos foram devidamente identificados e mantidos a -20°C até a realização do sequenciamento. Os DNAs purificados foram analisados em gel de agarose 0,8% e imersos em tampão TAE 1X.

As amostras foram enviadas ao Laboratório Sonda - IBqM/UFRJ para serem sequenciadas e os resultados foram comparados a sequências referências tipos I, II e III através de um software para análises de sequências de DNA, chamado DNASTAR® (Lasergene), para a detecção dos genótipos do parasito.

Quando todos os nucleotídeos presentes na sequência de DNA de um dos isolados foram comuns ao genótipo referência tipo I, este isolado foi considerado possuidor de alelo tipo I para aquele *locus*. Quando todos os nucleotídeos presentes forem comuns ao genótipo referência tipo II, este isolado foi classificado como tipo II. Quando todos os nucleotídeos foram comuns ao genótipo tipo III, este isolado foi classificado como tipo III. No entanto, quando nucleotídeos comuns a dois ou três genótipos foram detectados na sequência de um isolado ao mesmo *locus*, este isolado foi considerado como possuidor de um alelo recombinante. Os nucleotídeos diferentes dos encontrados para quaisquer dos três genótipos referência foram considerados atípicos.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA

Na avaliação da presença de anticorpos anti-*T.gondii* pelo MAT foi verificado que, dos 50 soros de ovinos analisados, 37 (74%) foram reagentes para titulação inicial de 1:25 até 1:3200 (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição da titulação de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos de uma propriedade do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

TITULAÇÃO	NÚMERO DE SORORREAGENTES
25	6
50	4
100	5
200	6
400	4
800	2
1600	2
≥ 3200	8
TOTAL	37

5.2 PROVA BIOLÓGICA EM CAMUNDONGOS

Nenhum isolado foi obtido de camundongos inoculados com amostras de carne ovina provenientes de açougues e estabelecimentos que a comercializam para o consumo no local.

Dos cinco animais selecionados dentre os oito que tinham títulos de anticorpos anti-*T. gondii* acima de 1:3200, foi possível isolar *T. gondii* em três destes (60%) e, dos 35 tecidos avaliados (sete por animal) isolou-se o parasito em dois de coxa (TgShBr18 e TgShB19), um de cérebro (TgShBr20) e um do “pool” da língua, músculo masseter e diafragma (TgShBr17), determinando ocorrência de 11,4% dentre os tecidos submetidos à prova biológica.

Com exceção dos isolados TgShBr19 e TgShBr20, os quais eram originários de tecidos de um mesmo animal, os demais foram oriundos de animais distintos. Apenas um isolado (TgShBr20) foi letal a 100% dos camundongos infectados primariamente. O isolado TgShBr17 foi letal a 40% dos camundongos e os isolados TgShBr18 e TgShBr19 a 20% destes roedores. O diagnóstico de toxoplasmose foi realizado por meio de observação de taquizoítos em esfregaços pulmonares dos camundongos que vieram a óbito. Os camundongos que não vieram a óbito e infectados com estes isolados supracitados apresentaram-se clinicamente normais durante todo o período de observação e a infectividade dos mesmos foi verificada por meio de sorologia pelo MAT (título $\geq 1:25$) e observação de cistos cerebrais após seis semanas de infecção (Tabela 2). As mortes dos camundongos infectados ocorreram entre o 13° e 17° DAI, com exceção do camundongo infectado com o isolado TgShBr19, que morreu ao 28° DAI (Tabela 2).

Tabela 2. Infectividade e mortalidade de camundongos inoculados com tecidos de ovinos infectados com *Toxoplasma gondii* oriundos de uma propriedade do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Identificação ^a	Tecido	Prova biológica ^b	DAI ^c	Cepa
24	(Diafragma/masseter/língua) ^d	5/5/2	16,18	TgShBr17
42	Músculo da coxa	5/5/1	17	TgShBr18
61	Músculo da coxa	5/5/1	28	TgShBr19
61	Cérebro	5/5/5	13,15,16	TgShBr20

^aMarcação do ovino em que se coletaram os tecidos.

^bNúmero de camundongos inoculados/infectados/mortos.

^cDias após a inoculação.

^dPool^o de tecidos coletados.

5.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO

Não foi detectado DNA do parasito nas análises moleculares das amostras de carne ovina obtidas de açougues e estabelecimentos especializados. A caracterização genética através da técnica “multi-locus DNA sequencing” permitiu identificar um único genótipo dentre os quatro isolados estudados (TgShBr17-20), com igualdade de alelos para todos os *loci* confirmada entre os mesmos, bem como a ausência de genótipos clonais (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Genótipos multi-locus de isolados de *Toxoplasma gondii* em tecidos de ovinos de uma propriedade do município de Campos dos Goytacazes, Brasil, através da técnica “multi-locus DNA sequencing”.

ISOLADOS	MARCADORES GENÉTICOS/CROMOSSOMO							
	c22-8/1b	L358/V	PK1/VI	SAG1/VIII	BTUB/IX	GRA6/X	SAG3/XII	Apico/Apicoplasto
TgShBr17	u-1	I	III	I	I	u-1	III	I
TgShBr18	u-1	I	III	I	I	u-1	III	I
TgShBr19	u-1	I	III	I	I	u-1	III	I
TgShBr20	u-1	I	III	I	I	u-1	III	I

"u" indica um alelo não arquétipo; I, III se referem a um alelo arquétipo de uma cepa Tipo I ou III.

Dentre todos os marcadores usados, SAG 1, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, L358, PK1 e Apico (Tabelas 3 e 4), em quatro cocorreu predominância de alelos tipo I (L358, SAG1, BTUB e Apico); dois de alelos tipo III (PK1 e SAG3) e dois foram atípicos (c22-8 e GRA6). Também foram constatado nucleotídeos não observados para quaisquer das linhagens clonais ao *locus* GRA6 para todos os isolados. É possível observar que a modificação no *locus* GRA6 ocorreu para o mesmo nucleotídeo (130). Para todos os isolados referência observa-se uma adenina, enquanto nos isolados TgShBr17-20 foi constatado uma citosina (Tabela 5).

Tabela 4. Caracterização genética de isolados de *Toxoplasma gondii* através da “multi-locus DNA sequencing” no Brasil.

GENÓTIPOS	ISOLADOS	MARCADORES MOLECULARES								REFERÊNCIA
		SAG1	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	L358	Pk1	Apico	
1	TgShBr17	I	III	I	u-1	u-1	I	III	I	Presente pesquisa
1	TgShBr18	I	III	I	u-1	u-1	I	III	I	Presente pesquisa
1	TgShBr19	I	III	I	u-1	u-1	I	III	I	Presente pesquisa
1	TgShBr20	I	III	I	u-1	u-1	I	III	I	Presente pesquisa
1	TgPgBr1	I	III	I	u-1	u-1	I	u-1	I	Frazão-Teixeira et al. 2011
1	TgPgBr2	I	III	I	u-1	u-1	I	u-1	I	Frazão-Teixeira et al. 2011
2	TgPgBr3	u-1	III	I	u-2	u-2	u-1	u-1	I	Frazão-Teixeira et al. 2011
Tipo III	TgPgBr4	II/III	III	III	u-3	III	III	u-2	III	Frazão-Teixeira et al. 2011
4	TgPgBr5	u-1	III	u-1	II		u-2	u-3	III	Frazão-Teixeira et al. 2011
NI ^a	TgPgBr06	u-1	u-1	III	-	u-1	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr07	u-1	u-1	III	-	u-2	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr08	u-1	u-1	III	-	u-3	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr09	u-2	u-2	u-1	-	u-4	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr10	u-1	u-1	III	-	u-5	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr11	u-1	u-2	III	-	u-6	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr12	u-2	u-3	III	-	u-1	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr13	u-2	u-4	III	-	u-1	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr14	u-2	u-4	III	-	u-1	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr15	u-1	u-5	u-2	-	u-1	-	-	-	Bezerra et al. 2012
NI	TgPgBr16	u-1	u-1	I/II	-	u-7	-	-	-	Bezerra et al. 2012
1	TgPgBr17	u-1	III	u-1	u-1	u-1	u-1	I	I	Jiménez-Sanz (2015) ^a
2	TgPgBr18	u-2	III	I	u-1	u-2	u-2	II	I	Jiménez-Sanz (2015)
3	TgPgBr19	I	III	III	u-2	u-3	III	u-1	I	Jiménez-Sanz (2015)

^a“u” indica um alelo não arquétipo; I, II, III se referem a um alelo arquétipo de uma cepa Tipo I, II ou III.

^aDados não publicados.

Tabela 5. Nucleotídeos atípicos (em destaque) detectados pela técnica “multi-locus DNA sequencing” nas sequências de DNA do marcador molecular GRA6 para *T. gondii* nos quatro isolados de tecidos ovinos de uma propriedade no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

GENÓTIPOS/ISOLADOS	NUCLEOTÍDEO						ALELO
	1	31	66	122	130	131	
<i>Consensus</i>	C	T	C	G	A	A	
RH (tipo I)	.	G	I
BEV (tipo II)	T	G	II
NED (tipo III)	.	.	T	A	.	.	III
TgShBr17	C	.	u-1
TgShBr18	C	.	u-1
TgShBr19	C	.	u-1
TgShBr20	C	.	u-1

6 DISCUSSÃO

A presente pesquisa foi estabelecida em duas partes, com o intuito de complementar os estudos prévios realizados com outros animais de produção neste município endêmico para toxoplasmose humana e animal. Na primeira parte da pesquisa, investigou-se a ingestão da carne disponibilizada para consumo humano no município como fonte de infecção humana. Paralelamente, pretendia-se esboçar a estrutura populacional genética do parasito em ovinos a partir dos isolados e sua correlação epidemiológico-molecular com cepas previamente obtidas em suínos no mesmo município (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; JIMENEZ-SANZ, 2015 – dados ainda não publicados). No entanto, não foi possível isolar o parasito nos tecidos adquiridos, seja por prova biológica como molecular. Tendo em vista os resultados de alta prevalência sorológica observados em ovinos criados neste município (COSENDEY-KEZENLEITE et al. 2014), uma das prováveis explicações para o não isolamento é o congelamento das amostras; 48,4% (15 de 31) destas foram adquiridas congeladas. Ainda, deve-se considerar que a carne ovina é adquirida numa proporção bem mais baixa que carnes de outros animais como bovinos, suínos e aves, atestado pelo baixo número de açougues especializados identificados neste município (Quadro 5). Com a baixa demanda pelas carnes, é plausível que as amostras adquiridas refrigeradas tenham sido primeiramente conservadas congeladas, descongeladas e comercializadas refrigeradas, o que também inviabilizaria o parasito. Segundo Kotula et al. (1991), formas do parasito em cistos teciduais (bradizoítos) são destruídos com o congelamento da carne a -12 °C em 12 horas. Também não foi detectado DNA de *T. gondii* nas amostras, o que em parte pode ser explicado pela pequena quantidade de tecido (25mg) que é analisada através desta técnica. Cabe ressaltar que outra possibilidade para o não isolamento e detecção de DNA de *T. gondii* das carnes provenientes dos açougues e dos vendedores de churrasco em espeto poderia ser a origem das mesmas, uma vez que não foi possível estabelecer se as carnes comercializadas nestes estabelecimentos eram provenientes de Campos dos Goytacazes, onde a soroprevalência em ovinos é alta, ou de outros municípios próximos, onde os animais podem não apresentar taxas de sororreatividade elevadas.

Apesar de não existirem dados acerca da frequência de consumo de carne crua ou mal cozida de ovinos no Brasil (DUBEY et al, 2012), sabe-se que esta espécie representa uma das principais fontes de transmissão de origem alimentar para seres humanos em todo o mundo (HASSANAIN et al., 2011). No entanto, em vista dos resultados aqui apresentados, é plausível inferir que a carne ovina comercializada *in natura* em açougues ou na forma de churrasco em espeto em estabelecimentos de Campos dos Goytacazes, RJ representa risco mínimo para infecção humana neste município. Halos et al. (2010) demonstraram em seus estudos que em localidades com elevada prevalência de anticorpos anti-*T.gondii* em ovinos havia também correspondência de elevados índices em humanos. Entretanto, segundo Dubey et al. (2008a), a prevalência de *T. gondii* em ovinos pode ser alta, mas o papel da ingestão da carne desta espécie na epidemiologia da toxoplasmose humana precisa ser determinado.

A conclusão acima não permite, todavia, descartar que o parasito esteja presente na carne de ovinos criados neste município. Desta forma, deu-se início à outra etapa desta pesquisa, em que foram selecionados ovinos com alta titulação para anticorpos anti-*T. gondii* para submissão de seus tecidos à prova biológica em camundongos e tentativa de isolamento do parasito. A detecção de parasitos viáveis nesta parte da pesquisa reforçaria que a falha no isolamento de *T. gondii* nas carnes adquiridas nos estabelecimentos comerciais do município poderia ter sido influenciada pela inativação dos parasitos pelo congelamento prévio dos tecidos.

A soroprevalência observada nos ovinos da propriedade selecionada para esta pesquisa (74%) corrobora os altos níveis de anticorpos anti-*T. gondii* presentes em animais desta espécie no estado do Rio de Janeiro (53,3%), como observado por Cosendey-KezenLeite et al. (2014). Estes autores demonstraram, também, alta prevalência para o município de Campos dos Goytacazes (43,57%). Próximos aos resultados do trabalho corrente, foram observadas por estes mesmos autores prevalências de 80,3% e 90,5% para as cidades de Cardoso Moreira e Itaboraí, respectivamente, sendo estes os níveis mais elevados observados em todo o estado. Luciano et al. (2011) investigaram a soroprevalência em ovinos criados em Casimiro de Abreu, Silva Jardim e Maricá, verificando frequência média de 38,1%. Estes dados demonstram que, não somente o município de Campos dos Goytacazes, mas também outros deste estado, apresentam alta frequência para

infecções por *T. gondii* na referida espécie. Isto pode representar impacto significativo em saúde pública, mas, como observado nesta pesquisa, a real influência da ingestão da carne adquirida em estabelecimentos comerciais na infecção humana precisa ser investigada através de prova biológica. Pernambuco, Minas Gerais e Rondônia são exemplos de outros estados brasileiros que também apresentaram elevada soroprevalência, com taxas de 60,8%, 57,6% e 56,9%, respectivamente (COSTA et al., 2102; BASSI et al., 2013; CAVALCANTE et al., 2004).

Dos 37 ovinos soropositivos, 27 (73%) expressaram titulação de 1:100 ou mais elevadas. Segundo levantamento realizado por Dubey (2010), titulações nessa escala do MAT são indicativas de animais persistentemente infectados, uma vez que este parasito é isolado com maior frequência nessas condições. Cosendey-KezenLeite et al. (2014), analisando ovinos criados em propriedades de todo o estado do Rio de Janeiro, verificaram que 48% dos 202 animais estudados apresentaram titulação igual ou superior a 1:100 ao MAT. Ragozo et al. (2008) utilizaram o mesmo teste sorológico e observaram que 26,7% de 120 ovinos criados em São Paulo também apresentaram esta titulação. Dubey et al. (2008a), por sua vez, verificaram que, de 104 cordeiros soropositivos e comercializados para consumo humano nos EUA, a infecção tecidual ocorreu em 60,6% dos animais com a titulação supracitada ao MAT. A taxa de animais com titulação acima de 1:100 verificada nesta pesquisa é reflexo do que ocorre em Campos dos Goytacazes e todo o Estado do Rio de Janeiro (COSENDEY-KEZENLEITE et al., 2014). No estudo soroepidemiológico realizado em fazendas de criação comercial de ovinos do Estado do Rio de Janeiro entre 2009 e 2010 (COSENDEY-KEZENLEITE, 2013), não foi possível o isolamento deste parasito a partir de tecidos dos animais. Conforme a autora expôs, isso provavelmente ocorreu devido à baixa titulação (1:25 e 1:50) dos animais utilizados na tentativa de isolamento deste protozoário em camundongos. Esta justificativa corrobora os achados de Ragozo et al. (2008), que não conseguiram isolar o parasito de animais na titulação de 1:25 (0 de 11 animais) e obtiveram apenas um isolado na titulação de 1:50 (1 de 19 animais).

No presente estudo, todos os 35 tecidos utilizados no experimento eram provenientes de cinco ovinos com titulação de 1:3200 ou superior, sendo obtidos quatro isolados no total, provenientes de três animais (60%). Para essa mesma

titulação, Ragozo et al. (2008) obtiveram nove isolados em 13 animais (69,2%). Dubey et al. (2008a) também relataram uma maior taxa de isolamento em cordeiros com titulações mais elevadas. O parasito foi isolado em seis de 13 (46,1%) animais com titulações de 1:50 ou 1:100, e em 47 de 54 (87%) com titulações de 1:200 ou maiores e não foi isolado de um cordeiro com titulação de 1:25. O sucesso do isolamento em animais criados neste município reforça a importância dos ovinos como transmissores da infecção à população humana e nos permite inferir que a carne comercializada para consumo provavelmente está infectada mas os parasitos viáveis são inativados pelo congelamento prévio dos tecidos, como discutido anteriormente.

O sucesso no isolamento de *T. gondii* em diafragma e cérebro, como ocorrido nesta pesquisa, já foi relatado por outros autores no Brasil (SPÓSITO FILHA et al., 1992, SILVA et al., 2011; SILVA e LANGONI, 2001; RAGOZO et al., 2008). Zia-Ali et al. (2007) também conseguiram isolar *T. gondii* destes tecidos no Irã. *T. gondii* foi isolado de língua e musculatura da perna de cordeiros nos EUA (DUBEY e KIRKBRIDE, 1989), assim como no presente estudo. Ragozo et al. (2008) apontaram que o sucesso em isolamentos obtidos nas diferentes pesquisas no Brasil (Quadro 3) e no mundo (Quadro 4) podem ter ocorrido não somente devido à densidade de *T. gondii* nos tecidos ovinos, mas também pelo tipo de tecido pesquisado. Silva et al. (2011), por sua vez, notaram uma diferença significativa entre provas biológicas de diferentes tecidos ovinos e o cérebro apresentou a positividade mais elevada. Ferreira et al. (2008) afirmaram que cérebro e músculo são os tecidos mais importantes no parasitismo por *T. gondii*. Vale ressaltar a importância do isolamento de *T. gondii* da musculatura da coxa no presente estudo pois, como evidenciado por Halos et al. (2010), a presença de parasitos vivos em outros tecidos não asseguram a sua presença em partes da carcaça que serão consumidas, como a musculatura esquelética.

Isolados da presente pesquisa apresentaram letalidades distintas a camundongos, incluindo as cepas isoladas do mesmo animal. No entanto, não houve diferença genotípica para as quatro cepas isoladas e denominadas TgShBr17-20 (Tabelas 3 e 4). Ragozo et al. (2008), no estado de São Paulo, observaram que nove dos 16 isolados (56,2%) de *T. gondii* em ovinos foram letais a camundongos e seis (37,5%) mataram 100% dos mesmos. Na presente pesquisa,

apenas um de quatro isolados (25%) levou 100% dos camundongos submetidos a prova biológica a óbito, mas em todos houve uma porcentagem de letalidade. Em ambos os trabalhos, fica claro que ovinos assintomáticos podem estar infectados com *T. gondii* virulento a camundongos e, assim, serem fonte de infecção para humanos. Uma das possíveis explicações para a variação da letalidade das quatro cepas, apesar de apresentarem o mesmo genótipo, seria a diferença nas cargas parasitárias. É interessante observar que os isolados da musculatura da coxa (TgShBr18 e TgShBr19), mesmo sendo de animais distintos, apresentaram taxas de letalidade iguais (20%). Em ovinos abatidos em São Paulo, foram obtidos seis isolados virulentos que mataram os camundongos entre 12 e 25 DAI. Dois isolados avirulentos pertenciam ao genótipo clonal tipo II, o qual não havia sido observado ainda no Brasil (SILVA et al., 2011). Todos os oito isolados do tipo II de ovelhas adultas na França (DUMÈTRE et al., 2006) e os 56 isolados de cordeiros dos EUA (DUBEY et al., 2008a) foram avirulentos a camundongos. No Brasil, todos os parasitos isolados de ovinos oriundos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina por Silva e Langoni (2001) foram não patogênicos a camundongos, o que está de acordo com Spósito Filha et al. (1992), que isolaram apenas cepas de *T. gondii* não patogênicas a camundongos de ovelhas criadas no Rio Grande do Sul, embora alguns tenham apresentado sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose.

Os genótipos isolados dos ovinos de Campos dos Goytacazes no presente estudo foram todos atípicos e iguais, mas diferentes de qualquer outro genótipo já descrito na literatura. Linhagens clonais clássicas são raras no Brasil (DUBEY et al., 2008a) e a maioria dos genótipos não clonais tem uma combinação de alelos dos tipos I, II e III em diferentes *loci*. Ainda não está claro se são simplesmente recombinantes de cruzamentos genéticos das cepas arquetípicas clonais tipos I, II e III.

Estudos de genotipagem com isolados obtidos de ovinos já foram realizados em outros países (Dubey et al., 2008a; Dumètre et al., 2006; Halos et al., 2010; Zia-Ali et al., 2007) e no Brasil (Ragozo et al., 2008, 2010; Silva et al., 2011). No entanto, assim como observado para o resto do mundo, a maioria dos trabalhos no Brasil utiliza a multi-locus PCR-RFLP para a caracterização genética de *T. gondii*, não somente em ovinos, mas também em outras espécies. Esta técnica não permite a observação de diferenças genéticas nucleotídeo a nucleotídeo, como acontece na

“multi-locus DNA sequencing”, sendo esta muito mais eficaz na diferenciação de isolados detectados na América do Sul e, mais especificamente, no Brasil, uma vez que, ao analisar os marcadores moleculares através desta técnica, confirma-se um alto nível de recombinação genética de *T. gondii* nestes locais. A multi-locus PCR-RFLP apresenta bons resultados para isolados da América do Norte, Europa e África por meio da detecção dos sítios de digestão das enzimas de restrição, o que permite a detecção de polimorfismos, mas não de mononucleotídeos atípicos comuns a genótipos da América do Sul (PENA et al. 2008). Desta forma, confirma-se que a “multi-locus DNA sequencing” é a técnica preconizada para a verificação da diversidade genética no Brasil em detrimento à multi-locus PCR-RFLP, como já foi demonstrado em outras pesquisas (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; MACIEL et al., 2014).

Comparando-se os padrões alélicos para os marcadores analisados nesta pesquisa pela “multi-locus DNA sequencing” com os demais trabalhos que utilizaram a mesma técnica no Brasil (Tabela 4) verifica-se que houve predominância de alelos tipo II em apenas dois *loci* (GRA6 e PK1), sendo estes observados por Frazão-Teixeira et al. (2011) e Jiménez-Sanz (2015– dados ainda não publicados), ambos em isolados de suínos. Este alelo clonal não foi observado em nenhum *locus* do genótipo isolado na presente pesquisa, sendo que da Silva et al. (2011) citam o isolamento deste tipo clonal em ovinos. No referido trabalho, os animais dos quais foram isolados *T. gondii* pertenciam a uma raça originária da Austrália e Nova Zelândia (Ideal) e extensivamente criada em Santana do Livramento e Uruguai, no estado do Rio Grande do Sul, onde fazem fronteira com Uruguai e Argentina. Os locais de origem desta raça apresentam elevada prevalência de cepas tipo II tanto em humanos quanto animais.

Como pôde ser verificado, os dados referentes ao sequenciamento ainda são escassos devido à maior utilização da técnica multi-locus PCR-RFLP. Até o momento, os estudos identificaram apenas uma pequena porção da diversidade global do parasito. Em ovinos, além da presente pesquisa, Maciel et al. (2014) realizaram a caracterização genética de amostras de *T. gondii* de ovinos criados no sul da Bahia e destinados ao consumo humano. Neste trabalho, a eficácia das técnicas de multi-locus PCR-RFLP e “multi-locus DNA sequencing” foram comparadas. No total, três cepas de *T. gondii* foram detectadas dos 200 cérebros

ovinos analisados (1,5%). Pela multi-locus PCR-RFLP, utilizando 10 marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, c22-8, PK1, GRA6, L358, c29-2 e apico,) foi encontrado um único genótipo comum a todas as amostras e este foi diferente de qualquer outro genótipo de *T. gondii* já publicado. O sequenciamento foi realizado para nove dos dez marcadores genéticos supracitados, exceto para c29-2 devido a problemas de qualidade no cromatograma de DNA. Apesar da análise de “multi-locus DNA sequencing” ter indicado que as três amostras de ovelhas eram diferentes, a variabilidade genética entre as mesmas não foi suficiente para classificá-las como genótipos diferentes na análise filogenética, sendo estas então classificadas na mesma linhagem.

Estes resultados reiteram que os achados de cepas de *T. gondii* no Brasil são frequentemente diferentes daqueles detectados em outros países e, desta forma, dificultam uma análise filogenética acurada. Fica evidente que a descoberta de novos genótipos no Brasil é uma constante e novos estudos tornarão possível o entendimento tanto da relação filogenética entre os isolados, quanto da correlação destes genótipos com a severidade da infecção na população brasileira e o monitoramento das principais vias de transmissão.

7 CONCLUSÕES

- O risco de infecção humana por *T. gondii* através da ingestão de carne ovina comercializada em açougues ou na forma de churrasco em espeto em estabelecimentos comerciais especializados em Campos dos Goytacazes e São Francisco do Itabapoana é mínimo;
- A elevada soroprevalência observada em ovinos para *T. gondii* demonstram que o agente pode estar amplamente distribuído de forma enzoótica no município de Campos dos Goytacazes;
- Devido aos isolados serem todos atípicos e ainda apresentarem nucleotídeos em *loci* ainda não observados em outros isolados, confirma-se a alta diversidade genética deste parasito na região estudada;
- A detecção de *T. gondii* viável em ovinos de uma propriedade reforça a importância de estudos posteriores de correlação filogenética com isolados de humanos, em especial de gestantes, principalmente por se tratar de um município endêmico para esta enfermidade e também para melhor direcionar o tratamento dos infectados.

REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, n. 32, p. 27-38, 2002.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; GARCÍA-MACHADO, C.; ALVARADO-ESQUIVEL, D.; VITELA-CORRALES, J.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Durango state, Mexico. **The Journal of Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 312-317, 2011.
- ANDRADE, M. M. C.; CARNEIRO, M.; MEDEIROS, A. D.; NETO, V. A.; VITOR, R. W. A. Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. **Parasite**, 20, 20, 2013.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2003.
- BAHRIENI, M.; HARANDI, M. F.; BEIGZADEH, M.; KAMYABI, H.; ZIA-ALI, N. Risk factors analysis associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in southeastern Iran using Modified Agglutination Test (MAT). **Iranian Journal of Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 38-43, 2008.
- BASSI, P. B.; BITTAR, J. F. F.; SILVA, C. C.; SANTOS, J. P.; BITTAR, E. R. Prevalência de parasitos gastrintestinais e de toxoplasmose em ovinos da região de Uberaba, MG. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 434-438, 2013.
- BERGER-SCHOCH, A. E.; HERRMANN, D. C.; SCHARES, G.; MÜLLER, N.; BERNET, D.; GOTTSTEIN, B.; FREY, C. F. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 290-297, 2011.
- BEZERRA, R. A.; CARVALHO, F. S.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. S.; MACIEL, B. M.; WENCESLAU, A. A.; LOPES, C. W. G.; ALBUQUERQUE, G. R. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 153-161, 2012.

BISPO, M. S.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C.; SALCEDO, J. H. P.; SOUZA, C. H.; SOUSA, D. P.; LIMA, M. M. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em propriedades de criação de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, p. 291-297, 2011.

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

CABALLERO-ORTEGA, H.; QUIROZ-ROMERO, H.; OLAZARÁN-JENKINS, S.; CORREA, D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 897-902, 2008.

CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; GOUVEIA, A. M. G.; VILAS-BOAS, L. S.; VITOR, R. W. A. Seroprevalence and risk factors of sheep toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 11, p. 527-531, 2009.

CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D. P.; MEIRELES, L. R.; ANDRADE, H. F.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; RUIZ, V. L. A.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em humanos e animais domésticos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 2004.

CHESSA, G.; CHISU, V.; PORCU, R.; MASALA, G. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* type II in sheep abortion in Sardinia, Italy. **Parasite**, 21, 6, 2014.

ÇIÇEK, H.; BABÜR, C.; ESER, M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in P1rlak sheep in the afyonkarahisar province of Turkey. **Turkiye parazitolojii dergisi**, v. 35, p. 137-139, 2011.

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

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa N. 12, de 20 de Setembro de 2013. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/313178/Resolucoes_Normativas.html>. Acesso em: 06 mai. 2014.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa N. 13, de 20 de Setembro de 2013. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/313178/Resolucoes_Normativas.html>. Acesso em: 06 mai. 2014.

COSENDEY-KEZENLEITE, R. I. J. **Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em ovinos e caprinos no estado do Rio de Janeiro-Brasil.** Tese (Doutorado), Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2013. 127p.

COSENDEY-KEZENLEITE, R. I. J.; OLIVEIRA, F. C. R.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E. F.; 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 and Production**, v. 46, p. 1463-1466, 2014.

COSTA, D. G.; MARVULO, M. F.; SILVA, J. S.; SANTANA, S. C.; MAGALHÃES, F. J.; FILHO, C. D.; RIBEIRO, V. O.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 679-680, 2012.

DE MOURA, A. B.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D. L.; MARANA, E. R. M. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 54-56, 2007.

DE OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; SALATA, E.; SOGAYAR, R. Serological survey for *Toxoplasma* infection in sheep in São Paulo, Brazil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 5, p. 121-125, 1993.

DE SOUZA, S.; AJZENBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L. CORREIA DA COSTA, J. M.; DARDÉ, M. L.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 133-136, 2006.

DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, M. V.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 185, 189, 2005.

DO AMARAL, V.; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M. M. Sobre a prevalência de anticorpos antitoxoplasma em soro de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente, dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil. **O Biológico**, v. 44, p. 331-340, 1978.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 4, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998a.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 75-77, 1998b.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 313p.

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. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lamb. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, p. 1715-1716, 1989.

DUBEY, J. P.; THAYER, D. W. Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. **International Journal of Parasitology**, v. 80, n. 5, p. 764-767, 1994.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190-195, 2009.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocysts from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 4, p. 636-662, 1970.

DUBEY, J. P.; BRAKE, R. J.; MURRELL, K. D.; FAYER, R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 3, p. 518-522, 1986.

DUBEY, J. P.; KOTULA, A. W.; SHARAR, A.; ANDREWS, C. D.; LINDSAY, D. S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 201-204, 1990.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; THAYER, D. W.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 724-727, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DA SILVA, D. S.; LEHMAN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n.4, p. 851-853, 2003.

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

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

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.

DUMÈTRE, A.; AJZENBERG, D.; ROZETTE, L.; MERCIER, A.; DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 376-379, 2006.

EDWARDS, J. F.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 129-136, 2013.

EL-NAWAWI, F. A.; TAWFIK, M. A.; SHAAPAN, R. M. Methods for inactivation of *Toxoplasma gondii* cysts in meat and tissues of experimentally infected sheep. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 5, p. 687-690, 2008.

FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; MEIRA, C. S.; HIRAMOTO, R. M.; PENALVA DE OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. P. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 221-227, 2008.

FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; de 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, p. 161-166, 2004.

FRANÇA, P. M. **Níveis de energia metabolizável na dieta de cordeiros Santa Inês e sua influência na composição química da carcaça e seus cortes.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2006. 89p.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E. **Caracterização genética de *Toxoplasma gondii* em suínos de Campos dos Goytacazes-RJ: comparação das técnicas multilocus PCR-RFLP e sequenciamento.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, 2009. 77p.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in a highly endemic area for human toxoplasmosis in Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 44-47, 2011.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J. P.; GRIGG, M. E.; OLIVEIRA, F. C. R. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n.1-2, p. 33-30, 2011.

FREIRE, R. L.; GIRALDI, N.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Levantamento soropidemiológico da toxoplasmose em ovinos na região de Londrina, Paraná. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 609-612, 1995.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. **Journal of Infectious Diseases**, v. 126, p. 664-673. 1972.

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

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 & Vectors**, v. 7, 425, 2014.

GHONEIM, N. H.; SHALABY, S. I.; HASSANAIN, N. A.; ZEEDAN, G. S.; SOLIMAN, Y. A.; ABDALHAMED, A. M. Comparative study between serological and molecular methods for diagnosis of toxoplasmosis in women and small ruminants in Egypt. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 2010.

GIANGASPERO, M.; BONFINI, B.; ORUSA, R.; SAVINI, G.; OSAWA, T.; HARASAWA, R. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetti*, *Brucella* spp., Leptospirosis and Orf virus among sheep from northern districts of Japan. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 75, n. 5, p. 679-684, 2013.

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

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C. MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 184, p. 633-639, 2001.

GUIMARÃES, L. A.; BEZERRA, R. A.; ROCHA, D. S.; ALBUQUERQUE, G. R. Prevalence and risk factors associated with anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in sheep from Bahia state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 220-224, 2013.

HALOS, L.; THÉBAULT, A.; AUBERT, D.; THOMAS, M.; PERRET, C.; GEERS, R.; ALLIOT, A.; ESCOTTE-BINET, S.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; DURANT, B.; BOIREAU, P.; VILLENA, I. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. **International Journal for Parasitology**, v.40, p. 193-200, 2010.

HALOVÁ, D.; MULCAHY, G.; RAFTER, P.; TURČEKOVÁ, L.; GRANT, T.; DE WALL, T. *Toxoplasma gondii* in Ireland: Seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. **Zoonoses Public Health**, v. 60, n. 2, p. 168-173, 2013.

HARTLEY, W. J.; MARSHALL, S. C. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 5, n. 4, p. 119-124. 1957.

HASSANAIN, M. A.; ELFADALY, H. A.; SHAAPAN, R. M.; HASSANAIN, N. A.; BARAKAT, A. M. Biological assay of *Toxoplasma gondii* Egyptian mutton isolates. **International Journal of Zoological Research**, v. 7, n. 4, p. 330-337, 2011.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELLER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii* and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v.30, n. 1, p. 67-95, 2000.

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

JIMÉNEZ-SANZ, A. L. **Detecção de *Toxoplasma gondii* em carnes de suínos comercializados em açougues de Campos dos Goytacazes, RJ, através de provas biológica e molecular.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, 2011. 60p.

JIMÉNEZ-SANZ, A. L. **Caracterização biológica e genética de isolados de *Toxoplasma gondii* de carnes de suínos em Campos dos Goytacazes, RJ.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, 2015. 76p.

JOKELAJINEN, P.; NAREAHO, A.; KNAAPI, S.; OKSANEN, A.; RIKULA, U.; SUKURA, A. *Toxoplasma gondii* in wild cervids and sheep in Finland: North-south gradient in seroprevalence. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3-4, p. 331-336, 2010.

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

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 163-172.

KHAMESIPOUR, F.; DOOSTI, A.; MOBARAKEH, H. I.; KOMBA, E. V. G. *Toxoplasma gondii* in cattle, camels and sheep in Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiary Provinces, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 6, 2014.

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D. B.; SIBLEY, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5881-5887, 2005.

KLUN, I.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; KATIĆ-RADIVOJEVIĆ, S.; NIKOLIĆ, A. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 121-131, 2006.

KOTULA, A. W. J.; DUBEY, J. P.; SHARAR, A. K.; ANDREWS, C. D.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 9, p. 687-690, 1991.

LANGONI, H.; GRECA, H.; GUIMARÃES, F. F.; ULMANN, 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 commercial sheep from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 50-54, 2011.

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

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

LOPES, A. P.; DUBEY, J. P.; NETO, F.; RODRIGUES, A.; MARTINS, T.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 266-269, 2013.

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

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 211-222, 1992.

MACIEL, B. M.; MOURA, R. L. S.; CARVALHO, F. S.; COSTA, E. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Identification and genetic characterization of a new brazilian genotype of *Toxoplasma gondii* from sheep intended for human consumption. **Parasitology International**, v. 63, p. 567-570, 2104.

MARTINS, J. R.; HANCOCK, R.; CORRÊA, B. L.; CERESÉR, V. H. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos no município de Livramento, RS: prevalência e implicações epidemiológicas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, p. 27-29, 1998.

MATURANO, A. M. P. **Estudo do efeito do peso de abate na qualidade da carne de cordeiros das raças Merino Australiano e Ile de France X Merino**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2003. 94p.

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

MENDONÇA, C. E. D.; BARROS, S. L. B.; GUIMARÃES, V. A. A.; FERRAUDO, A. S. MUNHOZ, A. D. Prevalence and risk factors associated to ovine toxoplasmosis in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 230-234, 2013.

MOAZENI JULA, F.; MOAZENI JULA, G.; NOWZARI, N.; KAVARI, A.; HASHEMZADEH FARHANG, H. A serological and molecular study on *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goat in Tabriz. **Archives of Razi Institute**, v. 68, n. 1, p. 29-35, 2013.

MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.; JUNIOR, G. L. M.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. Occurrence on anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheeps in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 312-317, 2011.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (on organism voisins) du gondii. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondii. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1909.

NISHIKAWA, H.; ARNONI, J. V.; RASSIER, D. S. S.; PIVATO, I.; SILVA, S. S. Prevalência de anticorpos antitoxoplásmicos em animais domésticos no Rio Grande do Sul. In: Encontro de Pesquisas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, 1984. p. 26-30.

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

OPSTEEGH, M.; TEUNIS, P.; MENSINK, M.; ZÜCHNER, L.; TITILINCU, A.; LANGELAAR, M.; VAN DER GIESSEN, J. Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch sheep using mixture models. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 96, p. 232-240, 2010.

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

PANADERO, R.; PAINCEIRA, A.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; PAZ, A.; DÍAZ, P.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; FERNÁNDEZ, G.; LAGO, N.; DÉZ-BAÑOS, P.; MORRONGO, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 111-115, 2010.

PENA, H. F. J.; 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.

PEREIRA, M. G. Amostras de conveniência. In: Pereira, M. G. **Epidemiologia teoria e prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, cap. 16.

PEREIRA, M. F.; PEIXOTO, R. M.; LANGONI, H.; JUNIOR, H. C.; AZEVEDO, S. S.; PORTO, W. J. N.; MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A. Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 140-146, 2012.

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

RAGOZO, A. M. A.; YAI, L. E. O.; 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. **The 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.

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, Paraná 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, n. 3-4, p. 252-259, 2011.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, p. 660-663, 1948.

SAKATA, F. B. L. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; MOURA, A. B.; SOUZA, A. P.; FARIAS, J. A. *Toxoplasma gondii* antibodies sheep in Lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison using IFA and ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n.3, p. 196-200, 2012.

SAMRA, N. A.; MCCRINDLE, C. M.; PENZHORN, B. L.; CENCI-CONGA, B. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 78, n. 3, p. 116-120, 2007.

SHAAPAN, R. M.; EL-NAWAWI, F. A.; TAWFIK, M. A. A. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 359-362, 2008.

SHAI DUZZAMAN, M.; ISLAM, R.; KHATUN, M. M.; BATANOVA, T. A.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in domestic animals and humans in Mymensingh District, Bangladesh. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 10, p. 1375-1376, 2011.

SILVA, A. V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 193-200, 2001.

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

SILVA, N. R. S.; DA COSTA, A. J.; DE SOUZA, S. M. G. Prevalência de anticorpos antitoxoplásmicos em ovinos, determinada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), no município de São Lourenço do Sul, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v. 8, p. 89-92, 1980.

SILVA, N. R. S.; DA COSTA, A. J.; CHAPLIN, E. L.; SOUZA, S. M. G. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de ovinos, pela reação de imunofluorescência indireta (IFI), na região de Guaíba, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v. 9, p. 101-104, 1981.

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

SILVA, D. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; LEHMANN, T.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in Southern Brazil highly endemic to humans. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 394-396, 2003a.

SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Sheep and goat toxoplasmosis: seroepidemiological study in two regions in the state of Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 115-119, 2003b.

SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo seroepidemiológico em duas regiões do estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 115-199, 2003c.

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.

SKJERVE, E.; WALDELAND, H.; NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 35, p. 219-227, 1998.

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.

SOCCOL, V. T.; CASTRO, E. A.; GAZDA, T. L.; GARCIA, G.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DITTRICH, R. L. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos das áreas urbanas e periurbanas de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 69-70, 2009.

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

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

TEMBUE, A. A. M.; ALVES, L. C.; COSTA, A. J.; FAUSTINO, M. G. A.; SOUSA, T. R.; ALBUQUERQUE, A. R.; RAMOS, R. A. N.; MARIA, I.; MEUNIER, J. Prevalence of IgG antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in goat and sheep from dry region of Pernambuco state, Brazil. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología**, v. 1, p. 82-85, 2009.

TESOLINI, P. M. A.; LEÃO, A. G. C.; BELTRAME, M. A. V.; GUMEIRO, M. V.; BARIONI, G. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da raça Santa Inês na região da Grande Vitória, estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 38-41, 2012.

The National Center for Biotechnology Information. **Taxonomy**. Disponível em: <http://www.ncbi.nih.gov/guide>. Acesso em: 23 Nov 2014.

TZANIDAKIS, N.; MAKSIMOV, P.; CONRATHS, F.; KIOSSIS, E.; BROZOS, C.; SOTIRAKI, S.; SCHARLES, G. *Toxoplasma gondii* in sheeps and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 340-348, 2012.

UENO, T. E. H.; GONÇALVES, V. S.; HEINEMANN, M. B.; DILLI, T. L.; AKIMOTO, B. M.; DE SOUZA, S. L.; 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 DER PUIJE, W. N. A.; BOSOMPEM, K. M.; CANACOO, E. A.; WASTLING, J. M.; AKANMORI, B. D. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. **Acta Tropica**, v. 76, p. 21-26, 2000.

VESCO, G.; BUFFOLANO, W.; LA CHIUSA, S.; MANCUSO, G.; CARACAPPA, S.; CHIANCA, A.; VILLARI, S.; CURRÒ, V.; LIGA, F.; PETERSEN, E. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 3-8, 2007.

WANG, C. R.; QIU, J.H.; GAO, J. F.; LIU, L. M.; WANG, C.; LIU, Q.; YAN, C.; ZHU, X. Q. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats in northeastern China. **Small Ruminant Research**, v. 97, p. 130-133, 2011.

WOLF, A.; COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an Encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. **Bulletin of the Neurology Institute of New York**, v. 6, p. 306-335, 1937.

YANG, N.; LI, H.; HE, J.; MU, M.; YANG, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Liaoning Province, Northeastern China. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 174-175, 2013.

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

ZONTA, J. C.; ARAÚJO, F. A. P.; STOBBE, N. S.; CHAPLIN, E. L.; SILVA, N. R. S. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em ovinos de Marau e de Uruguaiana, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.15/16, p. 59-61, 1987.

