

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM SUÍNOS,
OVINOS E CANÍDEOS DA REGIÃO DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO
DOURO**

Relatório Final de Estágio

Licenciatura em Biologia

Dário Lúcio Ferreira de Jesus



VILA REAL, 2008

Orientadora:

Dra. Ana Patrícia Antunes Lopes

Coordenador:

Professor Doutor Luís Lucas Cardoso

Classificação:

Júri de apreciação:

Presidente:

1º Vogal

2º Vogal

____/____/____

Agradecimentos

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pelo apoio institucional fundamental para a realização deste estágio.

À coordenadora da Licenciatura em Biologia, Professora Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio (DEBA, UTAD) pelo ajuda e orientação na escolha do estágio.

À Professora Doutora Maria da Conceição C. Martins Colaço Rosário, Coordenadora do Departamento de Ciências Veterinárias da UTAD pela possibilidade de estagiar no Laboratório de Parasitologia.

À Professora Doutora Maria Manuela Rodrigues (DCV, UTAD) pela simpatia e amabilidade com que me acolheu no Laboratório de Parasitologia da UTAD.

À minha orientadora Dra. Ana Patrícia Antunes Lopes (DCV, UTAD) por todo o conhecimento que me transmitiu, pela inigualável e inestimável contribuição prestada em todos os momentos da execução deste trabalho, pela disposição e boa vontade com que dispôs em me ajudar, pela correção exaustiva deste relatório e pela simpatia e amizade que sempre demonstrou.

Ao Professor Doutor Luís Lucas Cardoso (DCV, UTAD) por ter aceite coordenar este estágio, pela disponibilidade, ajuda no tratamento estatístico dos resultados, pela revisão científica do relatório e por ser um grande exemplo de profissionalismo, ética e competência.

À Professora Doutora Amélia Maria Lopes Dias da Silva (DEBA, UTAD) pela amizade e orientação na decisão de escolha deste estágio.

À Engenheira Teresa Coutinho (DCV, UTAD) pelos ensinamentos em várias técnicas laboratoriais, pelo apoio na componente prática deste trabalho, pela amizade e pelo exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos meus pais, pacientes e apoiantes de todas as decisões da minha vida.

À minha namorada, pela compreensão nos momentos de ausência, pela ajuda caseira neste relatório e por me apoiar nas decisões mais complicadas.

A todos os meus grandes amigos, por momentos únicos de convívio e por simplesmente serem meus amigos.

Índice

Índice	IV
Resumo	VII
Lista de figuras	VIII
Lista de tabelas	VIII
Lista de abreviaturas	X

I - Revisão da Literatura 1

1. Introdução	2
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.1. Taxonomia.....	3
2.2. Formas infectantes de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.2.1. Oocistos.....	3
2.2.2. Taquizoítos.....	3
2.2.3. Bradizoíto.....	4
2.3. Ciclo biológico	5
2.4. Genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
3. Resposta imunitária.....	7
3.1. Imunidade humoral.....	7
3.2. Imunidade celular	8
4. Patogenia da toxoplasmose	9
5. A infecção no gato.....	11
5.1. Transmissão ao gato	12
5.2. Distribuição e prevalência da infecção em gatos	12
5.3. Lesões e sinais clínicos.....	13
6. A infecção no Homem	13
6.1. Transmissão ao Homem	14
6.2. Distribuição e prevalência da infecção nos seres humanos.....	16

7. A infecção em ovinos	17
7.1. Transmissão aos ovinos.....	17
7.2. Distribuição e prevalência da infecção em ovinos.....	18
7.3. Lesões e sinais clínicos.....	18
8. A infecção no cão	19
8.1. Transmissão, lesões e sinais clínicos.....	19
8.2. Distribuição e prevalências da infecção em cães	20
9. A infecção nos suínos	21
9.1. Transmissão aos suínos	21
9.2. Distribuição e prevalências de infecção em suínos	22
9.3. Lesões e sinais clínicos.....	22
10. Diagnóstico laboratorial da infecção.....	23
10.1. Detecção do agente.....	23
10.1.1. Imuno-histoquímica	23
10.1.2. Inoculação experimental	24
10.1.3. Reacção em cadeia da polimerase.....	24
10.2. Detecção de anticorpos específicos.....	25
10.2.1. Teste de lise (“ <i>dye-test</i> ”- DT).....	25
10.2.2. Teste da imunofluorescência indirecta- IFAT	26
10.2.3. Testes de aglutinação (DAT, MAT e IHAT).....	26
10.2.4. Ensaio imunoenzimático- ELISA	27
11. Profilaxia	28
II - Componente experimental	1
1. Introdução	2
2. Material e métodos	3
2.1. Inquéritos realizados.....	3
2.2. Amostras recolhidas	3
2.2.1. Cães.....	3
2.2.2. Suínos.....	4
2.2.3. Ovinos	4
2.3. Detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	4

2.4. Metodologia.....	5
2.4.1. Leitura e interpretação dos resultados.....	6
2.5. Análise dos dados	7
3. Resultados	7
3.1. Inquéritos.....	7
3.2. Prevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	7
3.2.1. Cães.....	7
3.2.2. Ovinos	8
3.2.3. Suínos.....	9
3.3. Factores de risco associados à seropositividade.....	9
3.3.1 Cães.....	9
3.3.2 Ovinos	14
4. Discussão dos resultados	15
5. Conclusão	20
Anexos	21
Referências	35

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório de elevada importância em saúde pública, sendo a toxoplasmose uma das zoonoses mais frequentes no globo terrestre. Este parasita tem como hospedeiro definitivo os felídeos e como hospedeiros intermediários todos os animais homeotérmicos. A infecção pode estar associada ao aborto e doença congénita nos hospedeiros intermediários. O objectivo do nosso trabalho foi determinar a seroprevalência e possíveis factores de risco associados à infecção em ovinos, suínos e canídeos, em várias zonas de Trás-os-Montes e Alto Douro. Recolheram-se 154 amostras de sangue de cães provenientes dos concelhos de Lamego (n=133), Bragança (n=12), Vila Real (n=3), Vinhais (n=3), Mogadouro (n=1) e Vimioso (n=1). Em relação aos ovinos, foram recolhidas 46 amostras de sangue na linha de abate de alguns matadouros: Matadouro de Resende; Matadouro Industrial do Cachão e Matadouro de Carne de Vinhais, provenientes dos concelhos de Lamego (n=18), Vinhais (n=13), Moimenta da Beira (n=4), Chaves (n=2), Vila Flor (n=2) e Macedo de Cavaleiros (n=1). Foram também incluídos no estudo 132 amostras de sangue de suínos recolhidas no Matadouro Industrial do Cachão e no Matadouro Herdeiros de José Morais & Borges, Lda, oriundos dos concelhos de Mirandela (n=21) e Chaves (n=112). Foi utilizado o teste de aglutinação directa modificado (MAT) para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e considerado como resultado positivo a aglutinação para uma diluição de 1/20. Obtivemos uma seroprevalência nos ovinos de 56,5% (26/46), 29,9% (46/154) nos cães e de 0% (0/132) nos suínos. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em cães adultos (>1 ano), em ovinos de sexo feminino, adultos e criados em regime extensivo. Desta forma, face a estes resultados podemos concluir que o cão e os ovinos são espécies vulneráveis à infecção e representam um factor de risco para a saúde pública.

Lista de figuras

Figura 1. Estádios de <i>T. gondii</i>	4
Figura 2. Ciclo biológico	5
Figura 3. Esquema de uma placa de microtitulação para diluição (diluição 1:10).....	5
Figura 4. Esquema de uma placa de microtitulação para leitura (diluição 1:20)	6

Lista de tabelas

Tabela I. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> em 6 conelhos da região de Trás-os-Montes e Alto Douro	8
Tabela II. Seroprevalência de infecção em ovinos por <i>Toxoplasma gondii</i> em 6 conelhos da região de Trás-os-Montes e Alto Douro	8
Tabela III. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo o sexo dos animais	9
Tabela VI. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> em jovens e adultos.....	10
Tabela V. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo os hábitos de vida dos animais	10
Tabela VI. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo o acesso ao exterior.....	11
Tabela VII. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo o alojamento dos animais	11
Tabela VIII. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> de acordo com o contacto com outros cães.....	12

Tabela IX. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> de acordo com o tipo de alimentação do animal	12
Tabela X. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo as deslocções do animal	13
Tabela XI. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> de acordo com a vacinação dos animais	13
Tabela XII. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo a desparasitação dos animais.....	13
Tabela XIII. Seroprevalência de infecção ovina por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo o sexo dos animais	14
Tabela XIV. Seroprevalência de infecção ovina por <i>Toxoplasma gondii</i> de acordo com a idade dos animais.....	14
Tabela XV. Seroprevalência de infecção canina por <i>Toxoplasma gondii</i> em relação ao regime das explorações.....	14

Lista de abreviaturas

2-ME — 2-beta-mercaptoetanol

BABS — “boric acid buffered solution” (solução tamponada de ácido bórico)

DNA — “desoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico)

dNTPs — “desoxyribonucleotide triphosphate” (desoxirribonucleotídeos trifosfatos)

DT — “dye test” (teste de lise)

ELISA — “enzyme-linked immunosorbent assay” (ensaio imunoenzimático)

HIV — “human immunodeficiency vírus” (vírus da imunodeficiência humana)

IFAT — “indirect fluorescence antibody test” (imunofluorescência indirecta)

IFN- γ — interferon gama

Ig — imunoglobulina

IHAT — “indirect hemagglutination test” (teste de hemaglutinação indirecta)

IL — interleucina

KD — “Kilo Daltons”

LAT — “latex agglutination test” (teste de aglutinação em látex)

NUTS III — Nomenclatura das Unidades Territoriais para fins Estatísticos

MAT — “modified agglutination test” (teste de aglutinação directa modificado)

NK — “natural killer”

NO — “nitric oxide” (óxido nítrico)

PBS — “phosphate buffered solution” (solução tampão de fosfato)

PCR — “polymerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase)

RFLP's — “restriction fragment length polymorphisms” (análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico)

RT-PCR — “reverse transcriptase PCR” (Reação da transcriptase reversa)

SFDT — “Sabin-Feldman dye test” (Teste do corante de Sabin-Feldman)

SIDA — síndrome de imunodeficiência adquirida

SNC — sistema nervoso central

Th T — “helper” (T auxiliar)

TNF- α — “tumor necrosis factor α ” (factor α de necrose dos tumores)

I – Revisão da Literatura

1. Introdução

A espécie *Toxoplasma gondii* encontra-se em quase todas as áreas do Mundo, infectando cerca de 20% da população humana tendo grande importância a nível médico e económico (Tenter *et al.*, 2000; Bhopale, 2003; Barragan e Sibley, 2003).

Reconhecida pela primeira vez na década de 1930, a distribuição e as elevadas seroprevalências de infecção por *T. gondii* só foram conhecidas nos anos 50 e 60, com os avanços dos testes serológicos e da microscopia (Tenter *et al.*, 2000).

No final dos anos 60 foi determinado o ciclo de vida do parasita, com a clarificação da fase assexuada e sexuada (Buxton *et al.*, 1997; Tenter *et al.*, 2000). Recentemente, através da utilização de técnicas de sequenciação genética foram descobertas estirpes diferentes de *T. gondii*, com diferentes virulências (Ajzenberg *et al.*, 2004).

O gato, hospedeiro definitivo do parasita, possui um papel importante nesta zoonose; além disso, a infecção em animais para consumo humano provoca grandes perdas económicas, por diminuição da comercialização das carnes, e uma fonte constante de infecção para os seres humanos (Lopes, 2007a).

A prevalência de infecção pode ser mais elevada em algumas espécies animais, exemplo disso são os ovinos, os caprinos, os suínos e os marsupiais; em contraste, os bovinos e os equinos aparecem relativamente menos infectados (Buxton e Innes, 1995; Tenter *et al.*, 2000; Hill e Dubey, 2002).

Desta forma, é elevada a importância do conhecimento profundo da etiologia da toxoplasmose para a saúde pública, o que justifica o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa que permitam a descoberta de formas de diminuição ou eliminação do perigo de infecção para o Homem.

2. *Toxoplasma gondii*

2.1. Taxonomia

Segundo Levine *et al.* (1980), a espécie *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908), pertence ao reino Protista (Haeckel, 1866); sub-reino *Protozoa* (Golffuss, 1918 e Von Siebold, 1845); filo Apicomplexa (Levine, 1970); classe *Sporozoa* (Leukart, 1879); ordem *Eucocidia* (Léger e Duboscq, 1910); sub-ordem *Eimeriina* (Léger, 1911); família *Sarcocystidae* (Poche, 1913); sub-família *Toxoplasmatinae* (Biocca, 1956) e género *Toxoplasma*.

2.2. Formas infectantes de *Toxoplasma gondii*

O protozoário *T. gondii* possui três estádios infectantes para os hospedeiros intermediários (HI) e para os hospedeiros definitivos (HD), o esporozoíto (no interior de oocistos) e os taquizoítos e bradizoítos (no interior de quistos tecidulares), a Figura 1 ilustra as formas infectantes do protozoário.

2.2.1. Oocistos

Os membros da família *Felidae*, incluindo o gato doméstico, são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos, em que ocorre a formação e eliminação, durante um intervalo de tempo limitado, de milhões de oocistos não esporulados (10 x 12 µm de diâmetro) com as fezes. Após esporulação no meio ambiente, cada oocisto contém 2 esporocistos cada um deles com 4 esporozoítos (Montoya e Lisenfeld, 2004).

2.2.2. Taquizoítos

Os taquizoítos (2-4 µm de largura e 4-8 µm de comprimento) são ovais e são a forma de multiplicação rápida do parasita (Carvalho, 2006).

2.2.3. Bradizoítos

Os bradizoítos encontram-se no interior de quistos e representam a forma latente ou crônica do parasita durante a vida do hospedeiro. São morfologicamente idênticos aos taquizoítos, mas multiplicam-se mais lentamente. Os quistos podem conter centenas de milhares de bradizoítos, localizando-se preferencialmente no cérebro e no músculo esquelético e cardíaco. Em hospedeiros imunodeprimidos os bradizoítos podem transformar-se novamente em taquizoítos causando uma nova infecção. (Montoya e Lisenfeld, 2004).

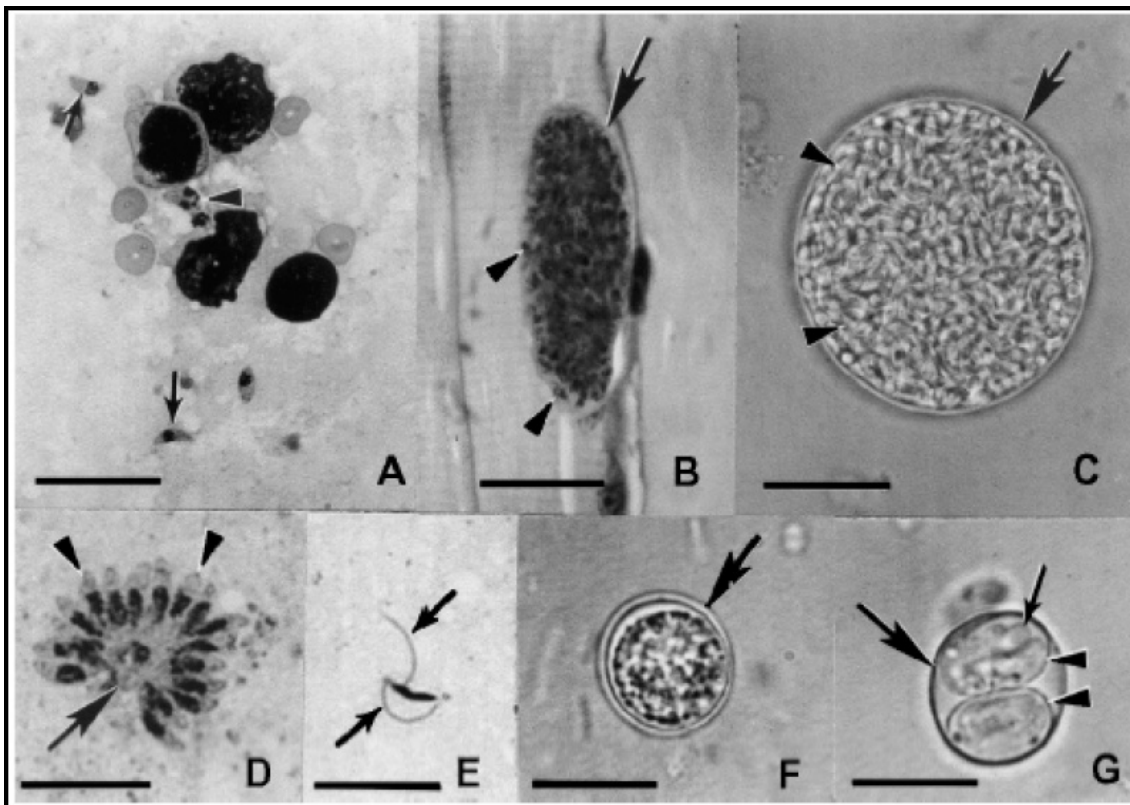


Figura 1. Estádios do *T. gondii*. (A) Taquizoítos (setas), taquizoítos em divisão (ponta da seta); (B) Quistos em corte histológico de músculo esquelético: parede fina do quisto (seta), bradizoítos (cabeças de seta); (C) Quisto isolado de cérebro infectado: parede do quisto (seta), bradizoítos (cabeças das setas); (D) Esquizonte com taquizoítos (cabeças de seta) presentes no intestino de gato infectado; (E) Gâmeta masculino com dois flagelos (setas) presente no intestino de um gato infectado; (F) Oocisto não esporulado; (G) oocisto esporulado, com dois esporocistos (Hill e Dubey, 2002).

2.3. Ciclo biológico

O *Toxoplasma gondii* é um parasita heteróxico, podendo infectar praticamente todos os animais homeotérmicos, como aves e mamíferos incluindo os seres humanos. Os hospedeiros intermediários podem ser todos os animais de sangue quente incluindo os felídeos (Tenter, *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2004a).

Como ilustra a Figura 2, quando o quisto é ingerido pelo hospedeiro definitivo, ocorre a libertação dos bradizoítos por acção de enzimas gástricas proteolíticas, os quais penetram na lâmina própria do intestino dando origem a uma fase assexuada (esquizogonia) e outra sexuada (gametogonia), com a formação de microgâmetas e macrogâmetas e posterior formação de oocistos. Os oocistos eliminados com as fezes não se encontram esporulados, ocorrendo a esporulação fora do felídeo no meio ambiente sob condições ambientais favoráveis de humidade, temperatura e arejamento, a esporulação demora entre 1 e 5 dias (Dubey *et al.*, 1998; Tenter *et al.*, 2000).

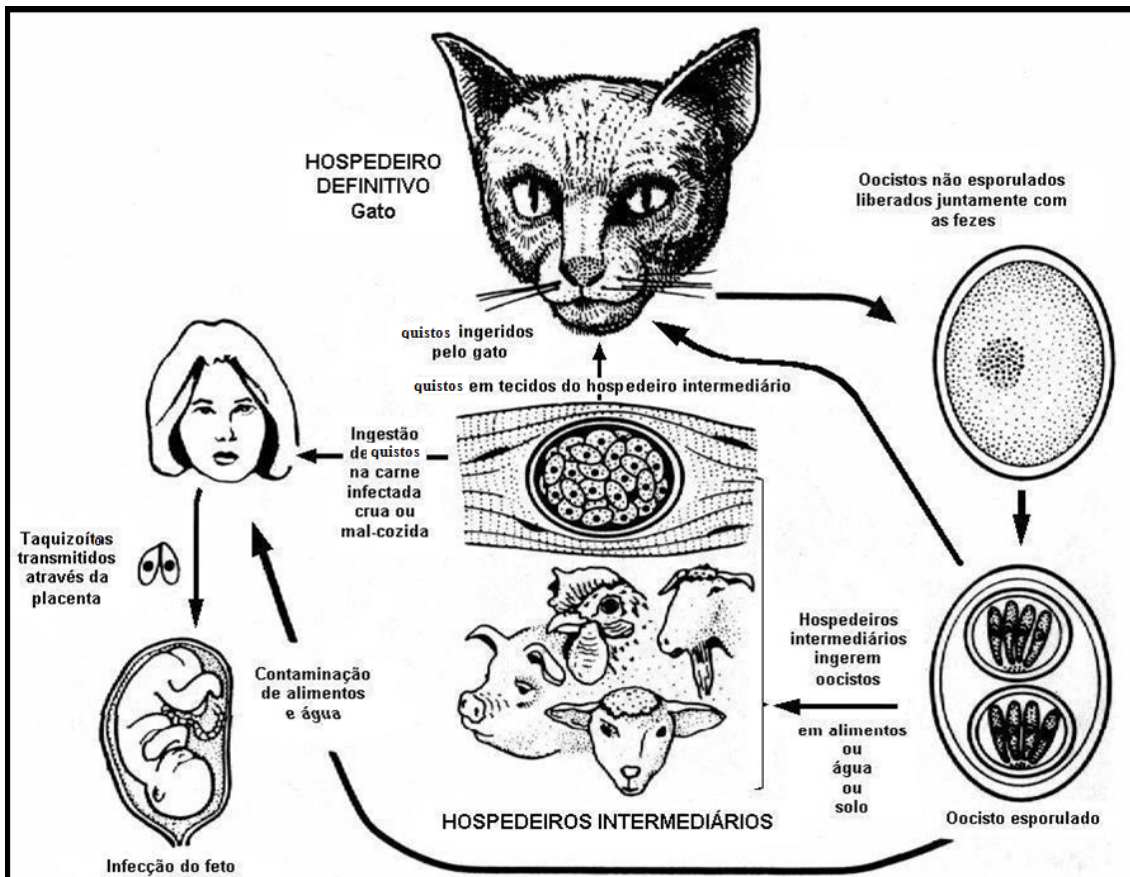


Figura 2. Ciclo biológico (adaptado de Hill e Dubey, 2002).

Quando hospedeiros intermediários, incluindo os felídeos, consomem tecidos contendo quistos, por carnivorismo, ou água contendo oocistos esporulados, podem adquirir a infecção. Por ingestão de alimentos, os bradizoítos, libertados dos quistos, ou os esporozoítos, libertados dos oocistos, penetram nas células do intestino, transformam-se em taquizoítos, os quais após multiplicações locais, disseminam-se por via sanguínea e linfática para vários órgãos, com posterior formação de quistos contendo bradizoítos (Dubey, 2004). Nos hospedeiros intermediários, os taquizoítos invadem vários tipos de células e multiplicam-se por endodiogenia, levando à ruptura das células-hospedeiras, ocorrendo libertação dos taquizoítos, os quais vão infectar novas células, iniciando-se novo ciclo de multiplicação. Desta forma, os taquizoítos infectam vários tecidos do hospedeiro, com especial afinidade para o cérebro e músculo (Montoya e Lisenfeld, 2004).

Quando os taquizoítos entram activamente nas células hospedeiras forma-se um vacúolo parasitóforo, que os protege dos mecanismos imunológicos (Dubey, 2004).

Após várias multiplicações dos taquizoítos, ocorre a formação de quistos tecidulares com bradizoítos. Os quistos podem permanecer nos hospedeiros intermediários durante toda a vida e representam a forma crónica da doença. Estudos realizados por Dubey (1998) sugerem que, a determinada altura, possa haver reactivação dos quistos e a produção de novos taquizoítos e posterior formação de novos quistos contendo bradizoítos.

2.4. Genótipos de *Toxoplasma gondii*

De uma forma geral, *T.gondii* possui uma estrutura populacional do tipo clonal, existindo 3 genótipos principais: os tipo I, II e III (Carruthers e Suzuki, 2007).

A maior parte dos genótipos isolados de doentes com a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) são do tipo II. O tipo I e tipo II têm sido predominantemente encontrados em doentes com toxoplasmose congénita, enquanto que a maior parte de isolados de animais pertence ao genótipo tipo III (Montoya e Lisenfeld, 2004).

O genótipo tipo I compreende estirpes altamente virulentas para murganhos. O genótipo tipo II e tipo III possui estirpes com virulência intermédia e estirpes avirulentas, respectivamente (Sibley, 2003).

As diferenças entre as diversas linhas foram efectivamente confirmadas nos estudos realizados por Sibley e Boothroyd (1992), através da análise “restriction fragment length polymorphisms” (RFLP) do DNA genómico.

Uma das diferenças entre as linhas genéticas de *T. gondii* é a virulência. Com efeito, foi descoberto que as estirpes virulentas tinham um antigénio 23 kilodaltons (KD) nas membranas, enquanto que as não virulentas possuíam antigénio 27 KD (Carruthers e Suzuki, 2007).

A reprodução sexuada entre duas linhas clonais distintas e competitivas de *T. gondii* provoca a evolução natural da virulência. A capacidade de infecção oral directa foi uma mudança recente que possibilitou a expansão deste protozoário (Sibley, 2003).

Num estudo recente, Carruthers e Suzuki (2007) demonstraram a possibilidade de *Toxoplasma gondii* estar envolvido na ocorrência de esquizofrenia. Desta forma, como os tipos II e III são menos agressivos que o tipo I, o tipo II pode estar envolvido na etiologia da doença e o tipo I parece contribuir para o seu desenvolvimento.

3. Resposta imunitária

Em hospedeiros imunocompetentes, as respostas celulares e humorais são importantes no controlo da infecção (Bophale, 2003). A imunidade à infecção é uma batalha contínua entre o agente patogénico e os mecanismos de defesa do hospedeiro, em que o parasita usa todas as estratégias possíveis para desencadear um processo de infecção (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

3.1. Imunidade humoral

A imunidade humoral induzida por *T. gondii* é principalmente dirigida contra os taquizoítos, uma vez que os anticorpos impedem a adesão do parasita à célula

hospedeira. Indivíduos com infecção crónica são geralmente resistentes a uma re-infecção devido à existência de imunoglobinas (Ig), que podem ser produzidas no sangue ou nos tecidos infectados (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

A IgG corresponde à maior classe de imunoglobinas envolvidas na resposta imunitária contra *T. gondii* (Ronday *et al.*, 1999). Após 1 a 2 meses da infecção ter ocorrido a IgG aparece e os seus níveis vão aumentando até cerca de 6-14 meses depois. Em infecções recentes a afinidade funcional das IgG aos antígenos é mais baixa (avidez baixa), à medida que a infecção avança, a sua quantidade diminui mas a sua avidez aumenta; desta forma a presença de IgG de alta avidez exclui a possibilidade de uma infecção recente (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

A IgM está associada a infecções recentes, contudo, permanecem mais tempo em circulação em comparação com as IgA. Desta forma, níveis persistentes de IgM na ausência de IgA indicam uma infecção antiga. Estes anticorpos podem ser detectados numa fase inicial da infecção, aumentando gradualmente e possuindo um pico pelos 1-2 meses, diminuindo depois até níveis não detectáveis por volta dos 8 meses pós-infecção. IgM detectadas no sangue de um recém-nascido são indicativas de infecção congénita, pois esta classe de Ig não possui a capacidade de atravessar a placenta (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

Por sua vez, a IgA é produzida quando os linfócitos localizados na lâmina própria são sensibilizados pelo parasita (Hegab e Al-Mutawa, 2003). Este tipo de anticorpos apenas é observado durante a fase aguda de primo-infecção, sendo importante para determinar uma infecção recente (Bophale, 2003).

3.2. Imunidade celular

A imunidade mediada por células desempenha a defesa principal no controlo da multiplicação e disseminação de *T. gondii* (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

Os taquizoítos podem infectar todo o tipo de células nucleadas, disseminando-se por todo o organismo (Denkers e Gazzinelli, 1998). A indução de uma resposta imunitária mediada pelas células T é importante, uma vez que permite a sobrevivência do parasita e do hospedeiro intermediário (Denkers e Gazzinelli, 1998). Segundo

Denkers e Gazzinelli (1998), a resposta imunitária influencia a presença de taquizoítos ou de bradizoítos, podendo induzir a conversão de taquizoítos em bradizoítos.

Os macrófagos, através da produção de mediadores imunológicos, apresentam um papel bastante importante na regulação da resposta imunitária celular (Bophale, 2003). Os macrófagos produzem interleucina 12 (IL-12), que por sua vez activa as células “natural killer” (NK) e as células T ocorrendo a produção de interferão- γ (IFN- γ), sendo esta a citocina mais importante envolvido no controlo de *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1993).

O IFN- γ e o factor α de necrose dos tumores (TNF- α) actuam em conjunto mediando a eliminação dos taquizoítos pelos macrófagos. A combinação destas duas citocinas provoca a produção de radicais livres e óxido nítrico (NO), ambos eficazes na eliminação do parasita (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

As células T “helper” (Th) CD4+ e T citotóxicos CD8+ actuam em conjunto para a protecção do indivíduo contra o parasita. Dentro da população de linfócitos, os CD8+ são considerados os principais responsáveis pela protecção contra o parasita, com os CD4+ a desempenharem um papel sinérgico produzindo IFN- γ e IL-2 que activam sinalizadores para outras células como as NK (Denkers e Gazzinelli, 1998; Bophale, 2003; Hegab e Al-Mutawa, 2003). Uma falha na regulação da produção de IFN- γ , pode provocar uma resposta inflamatória no indivíduo (Bophale, 2003).

Os tecidos ocular e cerebral são locais imunologicamente privilegiados, onde a resposta imunitária local é controlada para evitar a destruição dos tecidos. Em circunstâncias normais, o fluido intra-ocular possui citocinas com efeito imunossupressor (Bophale, 2003). No cérebro as células da micróglia possuem um papel importante no controle da resposta imunológica (Bophale, 2003; Carruthers e Suzuki, 2007).

4. Patogenia da toxoplasmose

Sabe-se, com a ajuda dos trabalhos desenvolvidos por Carruthers e Suzuki (2007), que bradizoítos, esporozoítos e taquizoítos apresentam diferenças na expressão

genética, capacidade de invasão e na taxa de multiplicação. O desenvolvimento de doença e as manifestações clínicas parecem ser directamente influenciadas pelo estágio do parasita que provoca a infecção; além disso, os sinais clínicos dependem da altura em que ocorre a infecção, ou seja, antes ou depois do nascimento.

Após a primo-infecção, a disseminação e multiplicação dos taquizoítos ocorre em órgãos específicos, provocando morte celular e necrose tecidual (Davidson, 2000). Uma infecção primária pode ser fatal, especialmente em animais jovens ou imunocomprometidos; contudo, na maioria das vezes as infecções são assintomáticas. A razão pela qual apenas alguns animais desenvolvem a doença, ainda não é muito bem compreendida (Davidson, 2000).

Toxoplasma gondii é capaz de infectar todo o tipo de células nucleadas e ultrapassar diversas barreiras de importância biológica. Após infecção oral, o parasita atravessa o epitélio intestinal e propaga-se para tecidos mais profundos, atravessando barreiras biológicas importantes como a placenta ou a barreira hemato-encefálica, com a finalidade de alcançar locais sensíveis do ponto de vista imunológico (Barragan e Sibley, 2003).

O primeiro passo para que ocorra invasão por parte do protozoário é o reconhecimento e ligação à célula-alvo, na qual o parasita irá percorrer a membrana celular até encontrar o ponto de junção reconhecido pelo pólo apical. Neste processo dois tipos de organelos parecem possuir um papel importante: as roptrias e os micronemas (Bhopale, 2003).

Segundo Carvalho (2006) o processo de invasão celular pelo parasita pode ser resumido em três etapas ou fases.

- 1) A adesão inicial do parasita à célula hospedeira ocorre sem orientação especial e envolve antígenos imunodominantes da superfície do parasita. Após a adesão inicial, os parasitas posicionam-se para a extorção do conóide, seguindo-se a formação do vacúolo parasitóforo, onde várias proteínas específicas de *T. gondii* são sintetizadas. As adesinas, secretadas pelos micronemas, são responsáveis pela espessa zona de adesão e formação da junção de movimento, que juntamente com o citoesqueleto do parasita, força-o para o interior do vacúolo parasitóforo em formação.

- 2) Exocitose de proteínas de próprias para o interior do vacúolo parasitóforo, as quais formam através das suas membranas uma associação com organelos da célula hospedeira, para que mitocôndrias e retículo endoplasmático sejam posicionados adjacentes ao vacúolo parasitóforo.
- 3) Proteínas dos grânulos densos são exocitadas e modificam a membrana do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a remodelação e maturação deste, com a formação de uma rede de maturação intravacuolar metabolicamente activa para a reprodução e desenvolvimento do parasita.

A membrana do vacúolo parasitóforo é formada por cerca de 80% da membrana da célula hospedeira e 20% da membrana fornecida pelo parasita (Carvalho, 2006).

A grande mobilidade de *T. gondii*, importante na invasão, tem também especial importância na capacidade do parasita em se disseminar pelos tecidos. A capacidade de atravessar barreiras biológicas permite-lhe atingir locais importantes do ponto de vista imunológico, como o sistema nervoso central e o feto em desenvolvimento.

O estudo e a compreensão dos processos de migração podem ser importantes no desenvolvimento de novas terapias (Barragan e Sibley, 2003).

5. A infecção no gato

Os gatos desempenham um papel primordial no ciclo biológico de *T. gondii*, uma vez que sendo hospedeiros definitivos excretam oocistos resistentes para o meio ambiente (Dubey e Beattlie, 1988). Os oocistos esporulados desempenham um importante papel na epidemiologia da infecção zoonótica como fonte directa ou indirecta de infecção para os seres humanos (Lopes, 2007a).

Desta forma, estudos epidemiológicos que permitam compreender os riscos para as populações, são importantes para tomar medidas preventivas, e estudar formas de controlar a contaminação ambiental, além da utilidade científica.

5.1. Transmissão ao gato

Segundo Hill *et al.* (2007) o gato pode adquirir a infecção através da ingestão de:

- oocistos nas fezes do próprio ou de outro gato.
- taquizoítos, por carnivorismo.
- quistos com bradizoítos, por carnivorismo, sendo esta a forma mais frequente.

Gatos com acesso ao exterior das habitações têm uma maior probabilidade de adquirirem a infecção (Tenter *et al.*, 2000). Os gatos também podem adquirir a infecção por via transplacentária (Dubey *et al.*, 1996) ou por via galactófora pelo consumo de leite materno infectado (Powell *et al.*, 2001). A concentração em enzimas proteolíticas no tubo digestivo dos gatinhos é geralmente inferior tornando-os mais sensíveis que os adultos à infecção pela ingestão de taquizoítos (Tenter *et al.*, 2000). Contudo, de acordo com Dubey *et al.* (1977), estes dois tipos de transmissão têm pouca importância em condições naturais.

A dinâmica da transmissão do parasita num determinado ambiente deve ser investigada considerando-se todos os elementos relevantes, incluindo as características físicas, a presença de eventuais hospedeiros intermediários e a própria estrutura das populações dos gatos (Afonso *et al.*, 2006).

A maioria dos gatos que vivem em liberdade infectam-se muito jovens, através da ingestão de tecidos infectados de hospedeiros intermediários como pequenos roedores e aves (Tenter *et al.*, 2000).

Segundo Lopes (2007a), os gatinhos podem adquirir a infecção a partir de irmãos infectados que eliminem oocistos. Contudo os gatos apresentam uma resistência natural aos oocistos, sendo necessário uma grande quantidade dos mesmos para que ocorra a infecção. Além disso, os grandes cuidados higiénicos maternos na limpeza das fezes, tornam a transmissão directa entre irmãos pouco provável.

5.2. Distribuição e prevalência da infecção em gatos

Para estudos epidemiológicos, os valores de seroprevalências são mais úteis que os resultados obtidos por exame coprológico, porque gatos seropositivos possuem uma maior probabilidade de terem excretados oocistos para o exterior, funcionando como indicadores de contaminação ambiental (Dubey e Frenkel, 1972).

Estudos serológicos demonstram que a seroprevalência varia entre 0 e 100% dependendo do método utilizado, do número de animais testados e da área geográfica (Dubey e Beattie, 1988). No Anexo I encontram-se valores de seroprevalências encontrados em gatos de vários países.

5.3. Lesões e sinais clínicos

Embora a infecção seja bastante prevalente, a toxoplasmose como afecção em gatos é na maioria dos casos pouco frequente. Quando a doença ocorre, as manifestações clínicas mais frequentes são: hepatite, efusão peritoneal, encefalite, lesões perivasculares e degenerativas do sistema nervoso central (SNC), ataxia, pirexia, entre outras. Na maioria dos casos, a toxoplasmose é um achado *post-mortem*, não existindo desta forma muita informação acerca da sintomatologia que um gato infectado pode apresentar. Foram descritos casos com febre, anorexia, letargia, sintomas respiratórios, vômitos, diarreia, coriorretinite e uveíte anterior, com que 75% dos gatos infectados a apresentarem algum tipo de lesão ocular (Meunier *et al.*, 2006; Dubey e Jones, 2008).

Os sinais clínicos podem persistir durante dias ou até meses. Teoricamente, qualquer órgão pode ser infectado, o que resulta na inexistência de sinais clínicos patognomônicos em gatos com toxoplasmose, embora se considere ser muito pouco frequentes as infecções generalizadas nos gatos. Por outro lado, a toxoplasmose é muito mais grave em gatinhos infectados por via transplacentária. Animais infectados podem morrer algumas horas após o nascimento (Campillo *et al.*, 1999).

6. A infecção no Homem

O protozoário *T. gondii* encontra-se distribuído mundialmente, sendo um dos agentes infecciosos mais prevalentes em seres humanos (Lappalainen e Hedman, 2004). A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns, uma vez que cerca de 1/3 da população mundial já esteve exposta ao parasita (Tenter *et al.*, 2000).

Em indivíduos com sistema imunitário debilitado, como os doentes portadores de vírus da imunodeficiência humana (HIV), pode ocorrer reactivação do parasita e posterior doença (Thjodleifsson *et al.*, 2006).

6.1. Transmissão ao Homem

Segundo Carvalho (2006) os seres humanos podem ser infectados pelas seguintes vias:

- Ingestão de carne crua ou mal passada contendo quistos tecidulares com bradizoítos, principalmente de suíno, ovino e caprino;
- Ingestão de água e/ou alimentos contaminados com oocistos esporulados;
- Transmissão congénita, por transferência de taquizoítos da mãe para o feto através da placenta, principalmente na fase aguda da infecção (transmissão vertical);
- Transplante de órgãos principalmente de coração, pulmão, fígado e rim de um dador infectado para um receptor seronegativo, ou de um dador seronegativo para um receptor seropositivo;
- Transfusão sanguínea de dadores infectados seropositivos;
- Acidentes laboratoriais ou entre profissionais de saúde com objectos perfurantes e/ou cortantes contaminados com taquizoítos, ou acidentes laboratoriais envolvendo animais infectados.

Nem todos os meios de transmissão são epidemiologicamente importantes, as fontes de infecção podem variar muito entre diferentes grupos étnicos e localizações geográficas. Desta forma o conhecimento das vias de transmissão mais prováveis é um pré-requisito para determinar estratégias de controlo e prevenção da infecção nos grupos de risco (Tenter *et al.*, 2000).

Os taquizoítos possuem o papel mais importante na transmissão vertical. Contudo, são bastante sensíveis às condições ambientais e geralmente perdem a viabilidade rapidamente fora dos hospedeiros, sendo as transmissões horizontais por taquizoítos normalmente pouco frequentes (Tenter *et al.*, 2000).

A infecção durante a gestação em mulheres imunodeficientes pode conduzir à transmissão do parasita ao feto e a toxoplasmose congénita do recém-nascido (Tenter *et al.*, 2000). O risco de aquisição da infecção intra-uterina e posteriores manifestações de toxoplasmose congénita dependem da altura em que ocorre a infecção materna, do estado imunitário da mãe durante a parasitemia, do número de parasitas, da virulência da estirpe transmitida e da idade do feto na altura da transmissão (Lopes, 2007a).

Os transplantes de órgãos podem ser complicados devido a infecções por *T. gondii*, em que taquizoítos e quistos parecem estar envolvidos. Além disso, os taquizoítos também podem ser transmitidos através de transfusões sanguíneas (Dubey e Beattie, 1988).

Os quistos de *T. gondii* são também uma importante fonte de transmissão, na Europa e nos EUA, sendo o consumo de carne de porco e de ovino considerado como uma das maiores fontes de infecção para os seres humanos (Dubey, 1994; Tenter *et al.*, 2000).

Surtos de toxoplasmose aguda estão epidemiologicamente ligados a oocistos nas populações em geral (Lopes, 2007a). Os oocistos esporulados presentes no ambiente, são também fontes importantes de infecção de seres humanos. A importância epidemiológica dos oocistos na transmissão do parasita é reforçada pela ausência ou por um pequeno número de infecções pelo parasita em ilhas onde nunca existiram gatos (Dubey *et al.*, 1997).

A probabilidade de seres humanos serem infectados por solo contaminado com fezes de gatos vadios é maior que a probabilidade de ser infectado por fezes provenientes de gatos domésticos, uma vez que os vadios caçam geralmente pequenos mamíferos e aves, nos quais o ciclo silvático de *T. gondii* é mantido, ficando os gatos mais expostos à infecção (Dubey, 1987; Dubey, 1994).

6.2. Distribuição e prevalência da infecção nos seres humanos

A toxoplasmose está generalizada em seres humanos e a sua prevalência varia de acordo com a localização geográfica e aumenta com a idade (Dubey, 2004); não varia muito entre os sexos, sendo mais baixa em regiões frias, quentes e áridas (Montoya e Lisenfeld, 2004).

Nos EUA e no Reino Unido estima-se que cerca de 16-40% da população esteja infectada, enquanto que na América Central e do Sul e na Europa a infecção atinge os 50-80% (Dubey e Beattie, 1988; Tenter *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001). Dubey e Jones (2008), num trabalho realizado nos EUA, determinaram que a seroprevalência da infecção por *T. gondii* entre africanos não hispânicos e americanos de descendência mexicana eram maiores relativamente a caucasianos não hispânicos, concluindo-se, que o risco de aquisição da infecção por *T. gondii* era maior entre indivíduos com baixos índices educacionais, que viviam em condições de sobrelotação e possuíam trabalhos relacionados com contacto com o solo.

A seroprevalência a nível mundial em mulheres em idade fértil varia entre 4% a 85% (Tenter *et al.*, 2000). Nos EUA aproximadamente 30% das mulheres em idade fértil possuem anticorpos contra *T. gondii* e; portanto, são imunes ao desenvolvimento de toxoplasmose (Dubey e Beattie, 1988; Dubey, 1994).

Países com baixas prevalências (< 20%), incluem a Tailândia (3%), o Japão e os EUA. A Austrália (23%), o Reino Unido (35%), a Polónia (36%) e a Bélgica (53%), possuem seroprevalências médias (Anexo II).

Estudos realizados em Portugal, por Ângelo (1979), determinaram a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em várias regiões do País, e o subsequente risco de infecção para as grávidas. Nesse mesmo estudo, os grupos etários mais baixos, apresentaram índices de seroconversão mais altos. O distrito de Viana do Castelo foi o que apresentou maior seroprevalência, em contraste com o distrito de Évora onde a prevalência foi mais baixa.

Mais tarde, Machado (2005) verificou uma seroprevalência de 25,6%, constatando uma diminuição na seroprevalência em comparação com o trabalho realizado por Ângelo (1979).

7. A infecção em ovinos

À infecção por *T. gondii*, associa-se importantes implicações em saúde pública e veterinária, sendo os suínos, os gatos, os ovinos e os caprinos os mais sensíveis à infecção pelo protozoário (Fusco *et al.*, 2007).

A toxoplasmose ovina foi descrita pela primeira vez na Nova Zelândia por Hartley *et al.* (1954) e por Hartley e Marshall (1957), sendo depois reconhecida em várias partes do Mundo. A infecção pelo parasita encontra-se entre as causas mais importantes de aborto em caprinos e em ovinos, particularmente em países com climas temperados como Nova Zelândia, França, Reino Unido e Noruega onde as condições de sobrevivência e esporulação dos oocistos são ótimas.

7.1. Transmissão aos ovinos

Há cerca de 30 anos a contaminação por fezes de gatos de pastagens onde ovinos se alimentavam, revelou-se como causa de aborto de algumas ovelhas (Plant *et al.*, 1974; Faull *et al.*, 1986).

Skjerve *et al.* (1998) mostraram uma associação entre a presença de gatos em explorações de ovinos e a exposição dos ovinos a *T. gondii*. Desta forma, na transmissão aos ovinos, tal como em outros animais, a contaminação ambiental parece ser a via de transmissão mais importante. Kijlstra *et al.* (2004) concluíram que os sistemas de produção de ovinos em que estes tinham acesso ao exterior predispunham-se a um maior nível de infecção, ao contrário dos sistemas intensivos, onde os níveis de positividade eram inferiores.

Estudos recentes demonstram que ovelhas sucessivamente infectadas por *T. gondii* podem transmitir a infecção aos fetos em gravidezes subsequentes (Buxton *et al.*, 2007). Algumas raças, como o charolês, são mais susceptíveis à infecção (Morley *et al.*, 2005). Contudo, estudos como o de Rodger *et al.* (2006) não detectaram transmissão transplacentária em ovinos.

7.2. Distribuição e prevalência da infecção em ovinos

Segundo Tenter *et al.* (2000), animais como ovinos e caprinos mantidos em pastos com uma elevada contaminação ambiental por oocistos, revelaram uma elevada seroprevalência em várias regiões do mundo (Anexo III).

A infecção em animais por *T. gondii* não resulta apenas em perdas económicas e reprodutivas, mas também possui importantes implicações em saúde pública (Jittapalpong *et al.*, 2005). Apesar da dificuldade em definir a incidência da toxoplasmose ovina, Blewett e Trees (1987) concluíram que no Reino Unido, as perdas anuais devido ao protozoário situam-se entre 1 e os 2 %. Estes dados permitem pressupor que tal seja idêntico em outros países da União Europeia.

Vários estudos comparam diferentes testes serológicos, de modo a determinar os mais específicos para a determinação das seroprevalências em ovinos (Marca *et al.*, 1996; Öncel *et al.*, 2005; Klun *et al.*, 2006; Shaapan *et al.*, 2008). Klun *et al.* (2007) comparam o ensaio imunoenzimático (ELISA) com o MAT e concluíram que para um título de 100 a sensibilidade do MAT aproximava-se da especificidade do ELISA. Dubey *et al.* (2008) apesar de não determinarem o título ideal para o estudo em ovinos, e do seu trabalho não visar a validação do MAT, conseguiram o isolamento de *T. gondii* após a utilização de um limiar de positividade de 50.

7.3. Lesões e sinais clínicos

Casos de toxoplasmose em ovinos adultos nunca foram documentados em qualquer parte do mundo (Dubey e Jones, 2008).

Quatro dias após a ingestão pelo ovino de oocistos esporulados de *T. gondii*, observa-se a multiplicação de taquizoítos nos gânglios linfáticos mesentéricos (Dubey, 1984; Buxton, 1998).

Dez dias após a infecção, surge febre e o parasita passa a ser encontrado no sangue (Dubey e Sharma, 1980; Reid *et al.*, 1982; Wastling *et al.*, 1993).

A infecção de ovelhas gestantes, provoca como sinal clínico mais importante o aborto. Contudo, o nascimento de nados mortos e/ou cordeiros com problemas de desenvolvimento são observados frequentemente assim como mumificação fetal e aparecimento de manchas brancas nas placentas características de necrose (Buxton *et al.*, 2007).

A infecção materna no início de gestação pode provocar morte fetal. A infecção numa fase tardia de gestação, quando o sistema imunitários do feto já se encontra mais desenvolvido, pode não provocar sinais clínicos, embora os cordeiros fiquem imunes (Watson e Beverley, 1971; Harley e Moyle, 1974; Blewett *et al.*, 1982).

8. A infecção no cão

Durante bastante tempo, as espécies *Neospora caninum* e *T. gondii*, foram confundidas, ou seja, o desconhecimento levava muitos investigadores a considerarem *N. caninum*, como responsável por quadros clínicos, que na realidade eram originados pelo *T. gondii*, no entanto, hoje conhece-se bem o ciclo de vida destes dois parasitas Apicomplexa (Dubey *et al.*, 1988).

8.1. Transmissão, lesões e sinais clínicos

O cão, hospedeiro intermediário no ciclo de vida do *T. gondii* (Lindsay *et al.*, 1997); pode, à semelhança de outros HI, adquirir a infecção através de duas vias:

- ingestão de oocistos esporulados por ingestão de água ou alimentos contaminados;
- ingestão por carnivorismo de quistos com bradizoítos presentes na musculatura ou vísceras de animais infectados.

Segundo Lindsay *et al.* (1997), a caracterização da infecção em canídeos é difícil, os autores infectaram cães através de oocistos esporulados de uma estirpe virulenta; contudo, apesar de se ter registado seropositividade, não foram detectados qualquer tipo de sinal clínico que sugerisse a influência do parasita. Dubey *et al.* (1995) observaram que o título de anticorpos anti-*Toxoplasma* não era directamente proporcional à gravidade das lesões.

Dubey e Jones (2008) referem o desconhecimento de casos de toxoplasmose congénita em cães. As infecções ligeiras são assintomáticas, contudo nas infecções mais intensas os sinais clínicos mais típicos incluem transtornos respiratórios (50% dos casos), digestivos (25%) e nervosos (25%), ao contrário do que acontece com os gatos, são raros os casos de toxoplasmose canina associada a lesões oculares (Campillo, 1999).

Os sinais clínicos da toxoplasmose muitas vezes são inespecíficos e podem confundir o diagnóstico da doença. Os sintomas mais frequentes são os associados ao sistema respiratório e digestivo, acompanhados de febre, anorexia, prostração e secreção ocular bilateral muco-purulenta. O comprometimento pulmonar é evidenciado pela tosse, espirros, secreção nasal catarro-purulenta e dispneia. Podem ainda ocorrer hepatite, linfadenomegalia mesentérica, obstrução intestinal pela formação de granulomas, peritonite. Sinais neurológicos como depressão, hiperactividade, paraplégia, ataxia e hemiparesia podem evidenciar encefalite causada pelo parasita (Dubey e Lappin, 1998; Dubey e Jones, 2008).

8.2. Distribuição e prevalências de infecção em cães

As técnicas serológicas são as mais indicadas no estudo da infecção por *T. gondii* em cães. A seroprevalência encontrada em cães varia de acordo com os seus hábitos de vida. Cães de caça, estão mais susceptíveis ao contacto com as fontes de contaminação ambiental, sendo esperados resultados de seropositividade superiores a animais confinados sem acesso ao exterior (Campillo, 1999). As seroprevalências em cães são normalmente altas (Anexo IV), indicando uma continua exposição às fontes ambientais e devido ao efeito cumulativo da idade (Tenter *et al.*, 2000).

Cães inoculados experimentalmente por via oral com oocistos esporulados excretaram oocistos infectantes juntamente com as fezes (Lindsay *et al.*, 1997). Esta observação sugere que os cães são um vector mecânico que actua na contaminação ambiental. Isto assume-se importante para a Saúde Pública, que torna os estudos seroepidemiológicos (Anexo II) importantes para a compreensão da zoonose.

9. A infecção nos suínos

Entre os múltiplos hospedeiros intermediários do protozoário *T. gondii*, os suínos apresentam um papel destacado, do ponto de vista da saúde pública, e constituem, juntamente com os ovinos, a principal fonte de transmissão ao Homem na Europa, estimando-se que cerca de 50% da carne de suíno esteja parasitada (Campillo, 1999).

Os suínos são considerados uma fonte importante de infecção em seres humanos (Dubey e Beattie, 1998), tendo ocorrido casos de toxoplasmose aguda no Homem pelo consumo de carne crua de porco infectada (Choi *et al.*, 1997).

A infecção em suínos encontra-se difundida por todo o Mundo, causando na maioria dos casos formas subclínicas de infecção. Contudo, em animais mais jovens surgem casos de doença (Hill *et al.*, 2007).

9.1. Transmissão aos suínos

Existem três vias pelas quais um suíno pode adquirir a infecção:

- Transmissão transplacentária: apesar da toxoplasmose congénita ter sido descrita em suínos, não existem estudos sobre a sua incidência.
- ingestão de carne de outro hospedeiro intermediário infectado ou alimentos contendo produtos animais infectados.
- ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados.

A maior parte dos suínos utilizados para consumo humano são criados maioritariamente em regimes intensivos, confinados a ambientes sem contacto com o exterior, havendo desta forma uma prevenção no contacto com roedores e/ou gatos, prevenção essa que tem tido efeitos positivos no declínio da seroprevalência na última década (Dubey e Jones, 2008).

Meerburg *et al.* (2006) concluíram que o número de gatos presentes em suiniculturas influenciava directamente a percentagem de suínos seropositivos.

Contudo, os efeitos da vacinação podem levar alguns anos até se tornarem evidentes, uma vez que os oocistos presentes no solo podem manter-se viáveis durante bastante tempo. Além disso, a vacinação de gatos pode provocar uma diminuição de oocistos presentes no ambiente; mas, não influenciar a transmissão vertical entre roedores, importantes reservatórios para a infecção por *T. gondii* (Kijlstra *et al.*, 2004).

Isto é corroborado por Dubey *et al.* (1997) que verificaram numa ilha remota da Geórgia do Sul e ilhas Sandwich, onde não existem gatos, a presença de anticorpos em 11 de 1264 animais estudados (0,9%) enquanto que na ilha principal da Geórgia 18% dos suínos eram seropositivos.

9.2. Distribuição e prevalências de infecção em suínos

A infecção do Homem pode verificar-se pelo consumo de carne de animais infectados, criados quer em sistema intensivo quer sistema extensivo, o que representa um grave problema de saúde pública (Coutinho *et al.*, 2005).

A prevalência de *T. gondii* em suínos é afectada pelo tipo de exploração. Em explorações pequenas em que os animais têm acesso ao exterior, Dubey e Jones (2008) obtiveram uma seroprevalência de 68%, enquanto que Correa *et al.* (2008) observaram uma seroprevalência de 32,1 % nos suínos testados (Anexo V).

De acordo com Dubey e Jones (2008), dependendo do tipo de suínos e da sua proveniência, a percentagem de *T. gondii* isolado de suínos varia entre 0,3% e 92,7%.

9.3. Lesões e sinais clínicos

Como referido anteriormente, a toxoplasmose em suínos é rara (Dubey e Jones, 2008). Os primeiros casos foram identificados por Farrel *et al.* (1952); os porcos infectados apresentavam tosse, incoordenação motora e diarreia, tendo ocorrido mortalidade de 50%.

Dubey *et al.* (1979) descreveram casos de toxoplasmose aguda em leitões numa quinta em Indiana (EUA): os leitões apresentavam necrose do intestino, encefalite e

pneumonia, e os taquizoítos eram visíveis nas lesões. Alguns desses leitões desenvolveram diarreia, 1-2 semanas após o nascimento, o que aponta para que os leitões tenham sido infectados por *T. gondii* logo após o nascimento. A infecção pós-natal é habitualmente subclínica, contudo pode causar febre ligeira, sendo raros os casos de anorexia, diarreia, dispneia e debilidade dos membros posteriores, mas podendo ocorrer a morte em animais jovens com estas manifestações em 9-15 dias (Dubey e Weissenbock, 1993; Campillo, 1999).

A primo-infecção em porcas gestantes pode originar abortos e partos prematuros, contudo é difícil reproduzir experimentalmente a transmissão congénita em suínos, tendo sido sugerido que o risco de transmissão ao feto depende da fase da gestação. Em casos de toxoplasmose fatal pode-se observar hipertrofia ganglionar generalizada, pneumonia intersticial, lesões necrótico-inflamatórias, com predomínio de células mononucleadas no fígado, baço, glândulas supra-renais, intestino delgado, linfonodos e miocárdio (Campillo, 1999).

10. Diagnóstico laboratorial da infecção

A infecção por *T. gondii* pode ser diagnosticada através de métodos indirectos como os métodos serológicos, ou directamente através de reacção em cadeia da polimerase (PCR), isolamento em cultura ou histologia (Montoya e Lisenfeld, 2004). Deste modo, diversas técnicas têm sido desenvolvidas nas ultimas décadas com o objectivo de se obter um diagnóstico mais preciso da infecção, bem como a determinação da fase da infecção em que o individuo se encontra (Carvalho, 2006).

10.1. Detecção do agente

10.1.1. Imuno-histoquímica

Técnicas de imuno-histoquímica são particularmente utilizadas para o isolamento de taquizoítos em cortes de tecidos ou em líquido provenientes de lavagem bronco-alveolar, sendo mais sensíveis que as técnicas histológicas convencionais (Montoya e Lisenfeld, 2004). Os taquizoítos podem ser detectados tanto em infecção aguda como em casos de reactivação das infecções crónicas (Montoya e Lisenfeld,

2004). A coloração imuno-histoquímica facilita a identificação de *T. gondii* em secções de tecidos ou de esfregaços, devido ao uso de anticorpos específicos conjugados com fluoresceína ou peroxidase (Hill e Dubey, 2002). A técnica da imunoperoxidase é a mais empregue e usa anticorpos monoclonais específicos para *T. gondii*. No entanto, a sensibilidade destas técnicas é relativamente baixa, sendo necessários bastantes cortes histológicos para se detectar os parasitas (Dubey, 1999).

10.1.2. Inoculação experimental

O sangue ou o sedimento após centrifugação, dos líquidos cefalorraquidiano, amniótico, líquido da lavagem brônquico-alveolar, suspensões de triturados de biópsias ou de placenta, pode-se inocular por via intraperitoneal em murganhos (Remington *et al.* 1994).

A sensibilidade do bioensaio em murganhos depende do estágio e do número de organismos infectantes presentes nos tecidos (Gajadhar *et al.*, 1998). Além disso, o bioensaio nestes animais é pouco prático para uma grande quantidade de amostras, pois apenas uma pequena quantidade de tecido pode ser testada (Hill e Dubey, 2002).

Apesar do tempo relativamente elevado para obtenção de resultados, a alta sensibilidade do teste permite considera-lo bastante útil no diagnóstico do *T. gondii*.

10.1.3. Reacção em cadeia da polimerase

A PCR é um método muito sensível. Em primeiro lugar, extrai-se o material genético da célula. Depois de extraído o DNA, a este é adicionada uma mistura (também conhecida como pré-mix) que contém os desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) que são “os tijolos” das novas moléculas, os *primers* (ou iniciadores) a enzima Taq DNA polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada na máquina de PCR, o termociclador, que faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exactos (Tamarin, 2002).

Desta forma, mesmo que *T. gondii* esteja presente em quantidade diminutas, o parasita pode ser identificado pela detecção de segmentos genéticos específicos, que após amplificação podem ser sequenciados (Rodrigues, 2006).

A sensibilidade e a especificidade da PCR são altas, mas dependem de alguns factores, tais como as técnicas utilizadas para a extracção do material genético da amostra, as condições de manipulação e armazenamento das amostras, as características da sequencia de DNA escolhida para a amplificação e a qualidade do DNA recolhido (Switaj *et al.*, 2005). A técnica da PCR demonstrou uma boa correlação com os diferentes métodos tradicionais de diagnóstico (Steuber *et al.*, 1995).

A principal vantagem da PCR, além da sua alta especificidade e sensibilidade, é a rapidez na obtenção dos resultados, principalmente pela PCR em tempo real (RT-PCR), mas a principal desvantagem encontram-se nos altos custos dos equipamentos necessários e na falta de “kits” comerciais padronizados (Switaj *et al.*, 2005). Outra desvantagem, é a impossibilidade de, através da PCR caracterizar a fase de uma infecção como por exemplo um resultado positivo não distinguir um paciente com uma encefalite de origem toxoplásmica de um doente com infecção crónica por *T. gondii* mas com outra etiologia.

10.2. Detecção de anticorpos específicos

Os métodos serológicos são os mais utilizados para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* e são baseados na detecção de diferentes classes de imunoglobinas (IgG, IgM, IgA e IgE). A análise desses resultados permite-nos concluir se estamos perante, uma infecção recente ou crónica, em fase de latência ou aguda (Contreras *et al.*, 2000).

10.2.1. Teste de Lise (“*dye test*”-DT)

Este teste, também conhecido como teste do corante de Sabin-Feldman (SFDT), foi o método serológico clássico de diagnóstico da toxoplasmose. Foi a primeira prova de alta sensibilidade a ser desenvolvida, mostrou-se capaz de evidenciar e quantificar, por diluição do soro, anticorpos reactivos às membranas do parasita (Sabin e Feldman, 1948).

O teste tem como fundamento a utilização de taquizoítos vivos que ficam corados na presença do corante azul de metileno, enquanto que os parasitas destruídos

pelo complemento não coram (Kijlstra *et al.*, 2004). Embora apresente boa reprodutibilidade e alta sensibilidade, alguns inconvenientes tornam-no pouco utilizado em vários laboratórios (Carvalho, 2006).

10.2.2. Teste da imunofluorescência indirecta – IFAT

Este teste possui boa especificidade e sensibilidade, comparável ao teste de Sabin-Feldman. Tem também a vantagem de utilizar taquizoítos preservados e fixados em lâminas microscópicas, tornando-o muito mais prático num laboratório. Por outro lado, permite a identificação de anticorpos segundo as classes de imunoglobinas (Rodrigues, 2006).

10.2.3. Testes de aglutinação (DAT, MAT e IHAT)

Técnicas de aglutinação têm sido largamente desenvolvidas para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, tais como o teste de aglutinação directa (DAT), teste de aglutinação directa modificada (MAT) e teste de hemaglutinação indirecta (IHAT).

O DAT utiliza taquizoítos tratados com formalina, que aglutinam na presença de anticorpos específicos. O teste de aglutinação directa tal como era utilizado até 1980 possuía dois grandes inconvenientes:

- Pouca sensibilidade; o título obtido pelo teste de aglutinação era geralmente muito inferior àquele obtido pelo DT ou pela IFAT. Como tal, alguns soros que eram positivos pelo DT e pela IFAT eram negativos pelo teste de aglutinação (Desmonts e Remington, 1980).
- Pouca especificidade.

Posteriormente Desmonts e Remington (1980), com a utilização do 2- β -mercaptoetanol (2-ME), criaram o MAT. A utilização de 2-ME desnatura as IgM específicas e não-específicas, o que permite ao MAT detectar somente IgG anti-*T. gondii*. Este método apresenta alta sensibilidade e especificidade, simplicidade e versatilidade, podendo ser utilizados para diagnóstico em várias espécies animais, incluindo no Homem.

O MAT é adequado a todos os laboratórios que executam a serologia apenas ocasionalmente, bem como aos que realizam rastreios em larga escala. Este teste, é um

meio simples e pouco dispendioso para a vigilância de indivíduos seronegativos durante a gestação e para a detecção de seroconversões em todos os animais (Desmonts e Remington, 1980). A técnica tem a vantagem de os seus resultados poderem ser expressos em unidades internacionais (UI), o que permite eliminar as causas de variação inerentes a cada laboratório, permitindo assim comparações de dados obtidos (Lopes, 2007b).

O teste de IHAT foi descrito originalmente por Jacobs e Lunde (1957) e baseia-se na aglutinação passiva de eritrócitos previamente sensibilizados com antígenos solúveis de *T. gondii* na presença de anticorpos específicos presentes no soro do paciente. Este teste não detecta IgM ou IgG de baixa avididade, além de sofrer interferência de anticorpos heterófilos resultando em falsos-positivos. O IHAT pode ser realizado em amostras de soro tratadas e não tratadas com 2-ME, permitindo desta forma a detecção de IgM específicas e o diagnóstico de infecção recente (Carvalho, 2006).

10.2.4. Ensaio imunoenzimático – ELISA

Este tipo de teste é actualmente dos mais utilizados na detecção de vários tipos de agentes infecciosos, inclusive *T. gondii*, baseando-se na reacção do soro com antígenos adsorvidos em placas de microtitulação. O anticorpo específico presente na amostra liga-se ao antígeno fixado nas cúpulas das placas, sendo o complexo anticorpo-antígeno demonstrado pela adição de conjugados imunoenzimáticos, seguido pela reacção da enzima com o seu substrato e tampão cromógeno (Carvalho, 2006).

As principais vantagens do ELISA são: obtenção de resultados mais objectivos, custo económico relativamente baixo e possibilidade de testar grandes quantidades de amostras num curto espaço de tempo, tendo larga aplicação em estudos de prevalências serológicas. Por outro lado, as principais desvantagens estão relacionadas com a reprodutibilidade dos resultados (Carvalho, 2006). O principal ensaio imunoenzimático utilizado na detecção de IgG é o método ELISA indirecto, no qual as placas são sensibilizadas com antígenos de *T. gondii*. Este ensaio apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, sendo muito utilizado em estudos seroepidemiológicos e existindo mesmo vários “kits” comerciais disponíveis (Montoya e Lisenfeld, 2004).

11. Profilaxia

A contaminação ambiental é elevada existindo elevadas prevalências em animais selvagens, incluindo mamíferos marinhos, provavelmente devido à contaminação nas linhas costeiras (McAllister, 2005).

Durante bastante tempo não foi dada a devida importância a este protozoário; contudo, nas últimas décadas verificou-se que patologias clínicas causadas por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes não são raras.

A infecção por *T. gondii* pode influenciar a saúde mental, embora sejam necessários mais estudos para delinear essa relação. Vários estudos demonstram um papel importante de *T. gondii* na esquizofrenia, nas alterações comportamentais e na inteligência em ratos. Diversos estudos, demonstram que surtos de toxoplasmose em seres humanos em várias regiões do Mundo, varia proporcionalmente às diferentes culturas e hábitos gastronómicos (Tenter *et al.*, 2000).

Hill e Dubey (2002) recomendam que a carne de qualquer animal seja cozinhada a pelo menos a 67 °C e os utensílios utilizados na sua confecção devem ser lavados com água quente e detergente no final da sua utilização. Boas práticas de higiene no local de confecção da comida são importante na prevenção da infecção. A congelação da carne a temperaturas iguais ou inferiores a -13°C pode tornar os quistos inviáveis.

Portanto, as pessoas em maior risco, como grávidas e indivíduos imunocomprometidos devem examinar os seus gatos para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, não sendo exame coprológico o mais indicado, apesar de rápido e simples, uma vez que os oocistos são excretados durante 1 a 2 semanas durante a vida do gato, após um período pré-patente de cerca de 20 dias, existindo muitos falsos negativos (Tenter *et al.*, 2000),

Um gato seronegativo é susceptível à infecção, e como tal deve ter-se especial cuidado com a água e alimentação, fornecendo-lhe apenas ração comercial ou comida caseira muito bem passada (> 65°C) e reduzir ao máximo a possibilidade de caçar hospedeiros intermediários, como ratos, aves ou invertebrados, evitando-se que tenham acesso ao exterior (Tenter *et al.*, 2000).

A caixa de areia do gato deve ser limpa diariamente utilizando luvas, e qualquer utensílio que entre em contacto com as fezes deve ser limpo com água quente (> 70°C) e sabão, de preferência por pessoas que não pertençam aos grupos de risco referidos anteriormente.

O uso de vacinas de forma a controlar a disseminação e a gravidade da toxoplasmose seria desejável (McAllister, 2005). A Nova Zelândia e alguns países da Europa utilizam uma vacina que contém taquizoítos da estirpe S48 e que visa diminuir os abortos em ovinos provocados pelo parasita (Buxton, 1993).

Outra vacina de grande importância seria aquela que administrada a gatos impediria ou diminuiria a excreção de oocistos (McAllister, 2005). Uma vacina contendo bradizoítos vivos da estirpe mutante T-263 foi produzida, e após administração oral a gatos o ciclo sexual do parasita fica bloqueado, uma vez que apenas se formava um tipo de gâmeta, não havendo formação e eliminação de oocistos (Dubey, 1996). Para um máximo de eficácia esta vacina tem de ser mantida congelada, porque os bradizoítos não sobrevivem mais do que algumas horas à temperatura ambiente.

Infelizmente, os bradizoítos da estirpe T-263 utilizados na vacina só poderiam ser desenvolvidos em ratos, ou seja, o processo de produção e purificação era difícil e economicamente não rentável para o fabricante (McAllister, 2005).

Os estudos recentes estão direccionados para a produção de uma vacina capaz de induzir uma resposta humoral, de forma a dar uma imunidade semelhante à imunidade adquirida por indivíduos imunocompetentes quando sujeitos uma infecção natural (Montoya e Lisenfeld, 2004).

A vacina ideal seria aquela aplicável ao Homem, contudo o desenvolvimento e a aceitação de uma vacina dessas é um processo lento, o que realça a importância das medidas de prevenção já mencionadas para o controle da infecção por *T. gondii* (McAllister, 2005).

II – COMPONENTE EXPERIMENTAL

1. Introdução

Na pesquisa bibliográfica realizada não foram encontrados em Portugal muitos estudos acerca da seroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais, nomeadamente em cães.

Em suínos podemos referenciar o trabalho de Coutinho *et al.* (2005), com uma seroprevalência de 9,3% em 1026 animais, e o trabalho de Sousa *et al.* (2006) com uma seroprevalência de 15,8% relativamente a 333 animais.

Antunes (1984) descreve uma seroprevalência em gatos de 71,0% e Meireles (1992) de 53,3%. O único trabalho conhecido em Trás-os-Montes e Alto Douro é o de Lopes *et al.* (2008) que encontraram uma seroprevalência de infecção felina por *T. gondii* de 35,8% (73/204).

Com este trabalho pretende-se determinar a prevalência da infecção por *T. gondii* em ovinos, em cães e em suínos da região de Trás-os-Montes e Alto Douro e dessa forma inferir acerca da sua potencial importância para a epidemiologia da infecção humana, bem como estudar e definir estratégias que permitam diminuir ou controlar a possibilidade de infecção.

Utilizou-se a técnica serológica de aglutinação directa para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, através da realização de um teste disponível comercialmente (Toxo-Screen DA®; bioMérieux, Lyon, França)

A sua utilização em várias espécies animais, colocam hoje o teste de aglutinação directa modificado (MAT) como o teste mais utilizado nos estudos seroepidemiológicos. Da comparação de vários testes serológicos, Garcia *et al.* (2008) concluíram que o MAT e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são os mais sensíveis. Quanto à facilidade de execução e à capacidade de detecção precoce da infecção, a preferência recai sobre o MAT.

Em gatos, Ljungstrom *et al.* (1994) consideram o Toxo-Screen DA® comparativamente à imunofluorescência indirecta (IFAT) o teste mais específico e sensível na detecção de anticorpos anti-*T. gondii*.

O método do Toxo-Screen DA® possui várias vantagens no diagnóstico de rotina em medicina veterinária: como este teste não necessita da preparação de imunoglobulinas específicas anti-espécie, o mesmo procedimento pode ser utilizado para todos os tipos de soros; a fiabilidade do teste é verificada por soros controlo positivo e controlo negativo bem como por um controlo do antigénio. Além disso, a análise pelo Toxo-Screen DA® é rápida e fácil de executar e não requer equipamento sofisticado (Ljungstrom *et al.*, 1994).

2. Material e Métodos

2.1. Inquéritos realizados

Juntamente com as colheitas de sangue realizadas, foi preenchido um questionário individual, com base nos dados conhecidos dos animais (Anexos XI e XII).

2.2. Amostras recolhidas

2.2.1. Cães

Foram recolhidos 154 amostras de soro de cão, consistindo em 38 (24,7%) fêmeas e 116 (75,3%) machos de várias raças e idades, compreendidas entre os 3 e os 156 meses. Alguns destes animais foram observados no Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, outros foram observados em clínicas veterinárias privadas com as quais estabelecemos contacto, e um grande número de amostras foram recolhidas durante a Campanha Nacional de Vacinação anti-rábica que acompanhámos pontualmente. Os animais eram provenientes de vários concelhos da zona de Trás-os-Montes e Alto Douro: Vila Real (n=3); Bragança (n=12); Vimioso (n=1); Mogadouro (n=1); Vinhais (n=3); Lamego (n=133) e 1 cão do qual não foi possível determinar a sua origem.

Cada amostra de sangue foi colhida da veia cefálica ou da veia jugular, para tubos de plástico com gel estabilizador da coagulação. O sangue foi deixado coagular à temperatura ambiente durante 3 horas e depois centrifugado a 1500-2000 rpm durante

10 minutos. As amostras de soro processadas foram conservadas a -20°C até à realização das análises.

2.2.2. Suínos

Foram obtidas 132 amostras de soro de suíno, constituídas por 71 (53,8%) fêmeas e 40 (30,3%) machos e 21 juvenis (leitões), com idades compreendidas entre os 1 e os 5 meses. A obtenção dos soros foi realizada durante o processo de abate no Matadouro Industrial do Cachão e no Matadouro Herdeiros de José Morais & Borges, Lda. Os animais eram provenientes dos concelhos de Mirandela (n=21) e de Chaves (n=112).

2.2.3. Ovinos

O número total de amostras que estudamos foi de 46. Num total de 34 animais de que tivemos oportunidade de identificar o sexo, 20 (58,8%) eram fêmeas e 14 (41,2%) eram machos. Em 6 animais não obtivemos esses dados. Relativamente à idade, os animais foram divididos em duas classes: jovens (menos de 12 meses) e adultos (mais de 12 meses). Os soros foram obtidos no momento de abate no Matadouro Industrial do Cachão; Matadouro Municipal de Resende e Matadouro Carne de Vinhais. Os diferentes animais eram provenientes dos seguintes concelhos: Lamego (n=18); Vinhais (n=13); Moimenta da Beira (n=4); Vila Flôr (n=2); Chaves (n=2); Macedo de Cavaleiros (n=1).

2.3. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Para a pesquisa de IgG anti-*Toxoplasma* utilizou-se o teste de aglutinação directa modificado (MAT) com base nos procedimentos descritos por Desmonts e Remington (1980) e por Dubey e Desmonts (1987) e com as alterações feitas por Lopes (2007b).

A pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi realizada através do uso de um “kit” comercial de aglutinação directa (Toxo-Screen DA®, bioMérieux, Lyon, França). O limiar de positividade (“*cut-off*”) escolhido, de forma a maximizar a sensibilidade do teste nas diferentes espécies testadas, foi de 20, tal como o utilizado por Dubey e

Desmonts (1987), Dubey *et al.* (2004), Lopes *et al.* (2008) em gatos, Dubey *et al.* (2007) em cães e Sousa *et al.* (2006) em suínos.

Foram utilizados placas de microtitulação com cúpulas em forma de U e não em cúpulas forma de V, uma vez que, segundo Desmonts e Remington (1980), as cúpulas em U permitem uma leitura mais fácil de suspensões que contenham poucos parasitas.

2.4. Metodologia

Introduzimos 90 µl de PBS nas cúpulas referentes à placa de microtitulação utilizada para a diluição, de seguida misturamos 10 µl de soro, de forma a obtermos em cada cúpula uma diluição de 1:10. Nas cúpulas F12 e G12 colocamos 10 µl dos soros controlo positivo e negativo respectivamente. A cúpula H12 é deixada vazia.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*											
B												
C												
D												
E												
F												P
G												N
H												Vazio

Figura 3. Esquema de uma placa de microtitulação para diluição (diluição 1:10).

*. 90 µl PBS + 10 µl soro = 100 µl diluição 1:10.

P. 90 µl PBS + 10 µl soro controlo positivo.

N. 90 µl PBS + 10 µl soro controlo negativo.

Seguidamente, retiramos 25 µl de cada cúpula com a diluição 1:10 e colocamos numa outra placa de microtitulação (placa de leitura), com a mesma disposição dos soros a testar e dos soros controlo positivo e negativo (Figura 4).

Posteriormente, adicionamos a esta segunda placa de microtitulação 25 µl de 2-ME diluído em PBS em todas as cúpulas, obtendo-se uma diluição final de 1:20.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*											
B												
C												
D												
E												
F												P
G												N
H												Ag

Figura 4. Esquema de uma placa de microtitulação para leitura (diluição 1:20).

*. 25 µl diluição 1:10 + 25 µl 2-ME + 50 µl de antígeno.

Ag. 25 µl de PBS + 25 µl 2-ME + 50 µl antígeno.

P. 25 µl diluição 1:10 soro controlo positivo + 25 µl 2-ME +50 µl de antígeno.

N. 25 µl diluição 1:10 soro controlo negativo + 25 µl 2-ME +50 µl de antígeno.

Finalmente, pipetamos para cada cúpula 50 µl da suspensão de antígeno toxoplásmico diluída a 1:5 em solução tamponada de ácido bórico (BABS) (pH 8,95). Na cúpula H12 realizou-se o controlo do antígeno, nas quais se colocou, 25 µl de PBS, 25 µl de 2-ME e 50 µl de suspensão de antígeno (Figura 4). Nas cúpulas F12 e G12 realizamos os controlos dos soros positivo e negativo.

Por último cobrimos as placas com uma folha transparente autocolante (incluída no “kit”) e agitamos levemente durante 1 minuto. A incubação das placas ocorreu durante 5 a 18 horas à temperatura ambiente (18-25°C), ao abrigo de vibrações e de eventual desidratação. A primeira leitura foi efectuada após 5 horas de incubação; se necessário uma segunda leitura pode ser feita após 18 horas de incubação.

O material e os reagentes utilizados encontram-se descritos no Anexo VI.

2.4.1. Leitura e interpretação dos resultados

A leitura das placas foi realizada à vista desarmada, com luz natural e seguindo os pressupostos de leitura e interpretação dos resultados descritos por Desmonts e Remington (1980) e por Ljungstrom *et al.* (1994) (Anexo VII).

2.5. Análise dos dados

Os valores de seroprevalência em grupos independentes foram comparados pelo teste estatístico do qui-quadrado (χ^2), utilizando o programa SPSS, versão 10.0 para Windows. Uma probabilidade inferior a 0,05 ($p < 0,05$) foi considerada como sendo estatisticamente significativa.

A prevalência foi definida como a percentagem de amostras com resultados positivos para os anticorpos anti-*T. gondii*, tendo sido estimada a partir da proporção dos resultados positivos no número total de soros examinados, com um intervalo de confiança binomial (IC) de 95% (Thrusfield, 1995).

3. Resultados

3.1. Inquéritos

O resultado dos inquéritos encontram-se nos Anexos VIII e IX. Os inquéritos realizados encontram-se nos Anexos X e XI.

3.2. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

3.2.1. Cães

De um total de 154 cães, 46 foram seropositivos e 108 foram seronegativos para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, o que resultou numa prevalência de 29,9%. Em relação, aos conelhos de onde eram provenientes os animais, os resultados das seroprevalências obtidas estão apresentados na Tabela I. Os resultados variaram entre 0% e 100%. No conelho de Vimioso não foram encontrados cães seropositivos.

Tabela I. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* em 6 concelhos da região de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Concelho	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência (%)
Bragança	12	6	50
Lamego	133	37	27,8
Mogadouro	1	1	100
Vila Real	3	1	33
Vimioso	1	0	0
Vinhais	3	1	33
Total	153	46	30,1

3.2.2. Ovinos

Num total de 46 animais, 26 apresentaram-se seropositivos para *T. gondii* e 20 ovinos demonstraram-se seronegativos para um limiar de positividade de 20, resultando numa seroprevalência de infecção de 56,5%. Na Tabela II encontram-se representadas as várias seroprevalências de infecção de acordo com a proveniência dos diferentes animais tendo variado entre 0% e 37%.

Tabela II. Seroprevalência de infecção em ovinos por *Toxoplasma gondii* em 6 concelhos da região de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Concelho	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência (%)
Chaves	2	0	0
Lamego	18	17	94,4
Macedo de Cavaleiros	1	1	100
Moimenta da Beira	4	0	0
Vila Flor	2	1	50
Vinhais	13	2	15,4
(sem dados)	6	5	83,3
Total	46	26	56,5

3.2.3. Suínos

Do total de 132 animais testados todos os soros demonstraram ser seronegativos para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*. Os animais eram provenientes dos concelhos de Chaves e Mirandela.

3.3. Factores de risco associados à seropositividade

3.3.1. Cães

A prevalência nas fêmeas foi de 26,3% e nos machos foi de 31,0%, não se verificando diferenças estatisticamente significativas relativamente ao sexo dos animais ($p>0,05$) (Tabela III).

Tabela III. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* segundo o sexo dos animais

Sexo	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Machos	75,3	116	36	31,0
Fêmeas	24,7	38	10	26,3
Total	100	154	46	29,9

* $p>0,05$

Da comparação entre os cães jovens e os adultos, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$). Apenas 6 dos 36 (16,7%) cães jovens (<12 meses) apresentaram-se seropositivos, enquanto que 36 dos 104 (34,6%) cães adultos (\geq 12 meses) foram seropositivos (Tabela IV).

Tabela IV. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma* em jovens e adultos.

Grupo etário	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Jovens (<12 meses)	25,7	36	6	16,7
Adultos (≥12 meses)	74,3	104	36	34,6
Total	100	140	42	29,9

* $p < 0,05$

A Tabela V apresenta os valores de seroprevalência de infecção canina por *T. gondii* de acordo com os hábitos de vida dos animais, não sendo estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O valor mais baixo (0,0%) foi verificado em cães que viviam exclusivamente no interior e o mais elevado (35,0%) em animais com vida exclusiva no exterior.

Tabela V. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* segundo os hábitos de vida dos animais.

Hábitos de Vida	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Acesso ao exterior e ao interior	28,6	44	11	33,0
Vida exclusiva no interior	2,6	4	0	0,0
Vida exclusiva no exterior	68,8	106	35	25,0
Total	100	154	46	29,9

* $p > 0,05$

Segundo o acesso ao exterior, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os animais confinados e os que tinham acesso ao exterior ($p > 0,05$), sendo a seroprevalência de infecção por *T.gondii* em animais com acesso ao exterior (29,9%) superior à dos cães confinados (0,0%).

Tabela VI. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* segundo o acesso ao exterior.

Hábitos de vida	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Cães confinados	2,6	4	0	0,0
Cães com acesso ao exterior	97,4	150	46	29,9
Total	100	154	46	29,9

*p>0,05

Na Tabela VII observaram-se algumas diferenças relativamente ao tipo de alojamento, contudo, essas diferenças não foram estatisticamente significativas, observando-se uma seroprevalência mais elevada (30,0%) nos animais que habitavam em vivendas, quintas ou na rua, comparativamente ao animais que viviam em apartamento (25,0%)

Tabela VII. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* segundo o alojamento dos animais.

Tipo de Alojamento	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Casa ^b	97,4	150	45	30,0
Apartamento	2,6	4	1	25,0
Total	100	154	46	29,9

*p>0,05

^b vivenda, quinta, rua

Das amostras testadas, foram analisadas 152 relativamente ao contacto com outros cães, verificando-se que 32 animais que contactavam com outros animais (26,7%) foram seropositivos. Contudo, no grupo de animais que não contactam com outros cães observou-se uma seroprevalencia mais elevada (40,6%), não sendo no entanto resultados estatisticamente significativos (p>0,05).

Tabela VIII. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* de acordo com o contacto com outros cães.

Contacto com outros cães	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Sim	78,9	120	32	26,7
Não	21,1	32	13	40,6
Total	100	152	45	37,5

*p>0,05

Relativamente ao tipo de dieta que era fornecida aos canídeos, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, entre as dietas mistas (29,4%) e as dietas comerciais (30,0%).

Tabela IX. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* de acordo com o tipo de alimentação do animal.

Tipo de alimentação	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência** (%)
Comercial	6,5	10	3	30,0
Mista^a	93,5	143	42	29,4
Total	100	153	45	29,4

**p>0,05

^aCaseira e/ou vísceras e Comercial

Relativamente a outras variáveis em estudo, excluindo as não validáveis, referenciamos outras estatisticamente não significativas, como as deslocações efectuadas pelos animais (p>0,05), a vacinação (p>0,05) e a desparasitação (p>0,05). A seroprevalência foi mais elevada naqueles animais que se deslocavam para fora da área de residência (37,5%), comparativamente aos que não se deslocavam ou apenas o faziam na área de residência (29,0%). Os animais vacinados obtiveram uma seroprevalência superior (57,1%) aos que não eram vacinados (28,0%), assim como os desparasitados (37,5%) em relação aos não desparasitados (24,4%).

Tabela X. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* segundo as deslocações dos animais.

Deslocações	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Área de residência ou sem deslocações	89,6	138	40	29,0
Fora da área de residência	10,4	16	6	37,5
Total	100	154	46	29,9

*p>0,05

Tabela XI. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* de acordo com a vacinação dos animais.

Vacinado^a	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Sim	4,7	7	4	57,1
Não	95,3	143	40	28,0
Total	100	150	44	29,3

^aVacinação anti-rábica

*p>0,05

Tabela XII. Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* segundo a desparasitação dos animais.

Desparasitado^a	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Sim	73,0	111	35	31,5
Não	27,0	41	10	24,4
Total	100	152	45	29,6

^a desparasitação anti-helmíntica realizada há menos de 6 meses

*p>0,05

3.3.2. Ovinos

Relativamente aos ovinos, os factores de risco analisados, foram todos estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ou seja, o sexo (Tabela XIII), a idade (Tabela XIV) e o regime de exploração (Tabela XV). A seroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em fêmeas (70,0%), em adultos (81,0%) e em animais criados em regime extensivo (77,3%) foi mais elevada.

Tabela XIII. Seroprevalência de infecção ovina por *Toxoplasma gondii* em segundo o sexo dos animais.

Sexo	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Machos	41,2	14	5	35,7
Fêmeas	58,8	20	14	70,0
Total	100	34	19	55,9

* $p < 0,05$

Tabela XIV. Seroprevalência de infecção ovina por *Toxoplasma gondii* de acordo com a idade dos animais.

Grupo etário	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Jovens (<12 meses)	47,5	19	4	21,1
Adultos (≥ 12 meses)	52,5	21	17	81,0
Total	100	40	21	52,5

* $p < 0,05$

Tabela XV. Seroprevalência de infecção ovina por *Toxoplasma gondii* em relação ao regime das explorações.

Regime	Distribuição relativa (%)	Animais testados (n)	Animais positivos (n)	Prevalência* (%)
Extensivo	55,0	22	17	77,3
Semi-intensivo	45,0	18	4	22,2
Total	100	40	21	52,5

* $p < 0,05$

4. Discussão dos resultados

Com a realização deste trabalho pretendeu-se, através da recolha de dados serológicos de cães, ovinos e suínos, investigar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em animais de algumas áreas de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Iniciando a nossa discussão pelos resultados obtidos nos canídeos, podemos dizer que os resultados positivos obtidos em cães (hospedeiros intermediários), representam uma evidência de contaminação ambiental. Desta forma, ao sabermos a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* numa determinada região podemos inferir acerca do grau de contaminação do ambiente e dos factores de risco associados a essa positividade e comparar os nossos dados com outros estudos e reflectir acerca da contaminação nos locais estudados. O número de animais envolvidos no estudo é relativamente reduzido e as amostras incluem um maior número de cães provenientes do concelho de Lamego. Estas circunstâncias não permitem garantir a representatividade da amostra relativamente população canina de Trás-os-Montes e Alto Douro,

O valor obtido no nosso estudo relativamente à seroprevalência em cães foi de 30,1%. No entanto, Azevedo *et al.* (2005) frisam as dificuldades em comparar os resultados devido às diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas, tamanho e origem das amostras e momento em que o estudo foi conduzido. Um aspecto importante na correlação e interpretação dos resultados é o conhecimento do grau de contaminação ambiental na região. Lopes *et al.* (2008) obtiveram resultados de seroprevalências de infecção em gatos relativamente elevados; portanto, a presença de oocistos é um dado favorável à existência de contaminação ambiental e possivelmente explicativa dos resultados que obtivemos em cães na mesma região. A percentagem por nós obtida foi semelhante à de outros países como EUA (Lindsay *et al.*, 1990), França (Cabannes *et al.*, 1998), Suécia (Björkmann *et al.*, 1994) e Trinidad e Tobago (Ali *et al.*, 2003).

No nosso trabalho todos os soros foram analisados utilizando o MAT como teste serológico, teste esse utilizado por vários investigadores (Dubey e Beattie, 1998; Ljungstrom *et al.*, 1994, Gauss *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2007; Shaapan *et al.*, 2008). Relativamente ao sexo dos canídeos obtivemos resultados muito idênticos: 31,0% nos machos e 26,3% nas fêmeas.

Varandas *et al.*(2001) concluíram que machos e fêmeas de qualquer idade estão sujeitos ao mesmo risco de infecção. Cheadle *et al.* (1999), além do sexo e da idade, não observaram diferenças significativas ($p>0,05$) quanto à raça e ao tipo de dieta administrada. Desta forma, o sexo dos animais não foi associado à seroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* tal como reportado por outros estudos (Arrias *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2005).

Relativamente à idade dos animais, podemos concluir que os animais jovens (< 12 meses) apresentaram uma seropositividade (16,7%) inferior à obtida nos animais adultos (34,6%), diferenças essas significativas ($p<0,05$). Podemos referir que os animais mais velhos possuem uma maior probabilidade de aquisição da infecção, pois com o avançar da idade existe um aumento de exposição aos estádios infectantes do parasita. Contudo, apesar de alguns estudos apoiarem os nossos resultados (Pereira, 2006), Além da idade do cão, a contaminação ambiental e o tipo de dieta fornecido são também importantes factores de risco para a infecção (Ali *et al.*, 2003). Childs e Seeger (1986) concluíram que a seroprevalência da infecção em cães, aumenta até aos 3 anos e depois diminui com o avançar da idade.

Os cães que possuíam acesso ao exterior e ao interior apresentaram uma seroprevalência superior (33,0%) aos que não tinham acesso ao exterior (0,0%). Não obstante, animais que vivam exclusivamente dentro de casa podem possuir anticorpos anti-*T. gondii*, essa devido provavelmente ao tipo de alimentação. Azevedo *et al.* (2005) não obtiveram tal como nós uma diferença estatisticamente significativa entre o acesso ao exterior e a seropositividade. Uma parte considerável da nossa amostra, é constituída por cães utilizados por caçadores, com grande contacto com o meio ambiente e fortemente expostos á infecção (Ali *et al.*, 2003).

Em relação ao tipo de alojamento, os cães que vivem em casas, incluindo vivendas com jardins e quintas, apresentaram uma seroprevalência superior (30,0%), embora não significativa, em relação aos animais que viviam em apartamentos (25,0%). Tal facto pode ser explicado devido aos animais em apartamentos terem um acesso mais limitado ao exterior, portanto seria de prever uma menor prevalência.

Cães que mantinham contacto com outros cães apresentaram uma seropositividade mais baixa (26,7%) do que os animais que não tinham esse contacto

(40,6%). Azevedo *et al.* (2005) mostrou um aumento na seroprevalência quando existe o contacto com gatos. No nosso trabalho, não consideramos o facto de cães que não tinham contacto com outros cães poderem ser cães de caça, de guarda ou outros que possam circular livremente e se tornem mais expostos à contaminação ambiental.

Relativamente à dieta dos animais, ao contrário dos resultados obtidos por alguns autores (Ali *et al.*, 2003; Cañon-Franco *et al.*, 2004; Lopes, 2007a), animais alimentados com comida comercial obtiveram uma maior prevalência (30,0%) em comparação com os animais alimentados com comida caseira (29,4%); no entanto, os animais alimentados com comida comercial podiam ter acesso ao exterior. Por outro lado, a comida comercial podia incluir a comida de lata, que por vezes são deixadas abertas até serem consumidas na sua totalidade, aumentando o risco de contaminação por oocistos presentes no meio ambiente; além disto, durante a sua preparação nem sempre se atinge a temperatura adequada (60-70°C) para que ocorra a destruição de eventuais quistos de *T. gondii*. Contudo, os resultados não foram estatisticamente significativos, e a amostra não é representativa de todos os cães da região. Por fim, os cães que foram submetidos a uma desparasitação contra endoparasitas, ao contrário do verificado por Lopes (2007a) em gatos, obtiveram uma seroprevalência superior (31,5%), à dos animais sem tratamento antiparasitário (24,4%), o que pode ser justificado pelo facto de no caso de serem animais sem acesso ao exterior os proprietários não os desparasitem, pois não consideram a necessidade desse acto. Este argumento também pode explicar a seroprevalência superior em animais vacinados (57,1%) comparativamente aos animais não vacinados (28,0%).

Vários testes serológicos foram estudados de modo a determinar qual o mais eficiente para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em ovinos (Marca *et al.*, 1996; da Silva e Langoni, 2001; Öncel *et al.*, 2005; Klun *et al.*, 2006). Shaapan *et al.* (2008) concluíram que o MAT foi o teste que apresentou maior sensibilidade (96%).

No estudo realizado em ovinos, também utilizamos o MAT como teste serológico.

No nosso estudo, obtivemos uma seroprevalência de 56,5% semelhante à obtida por outros estudos em diferentes países: Brasil (Clementino *et al.*, 2007); Egipto (Shaapan *et al.*, 2008); Itália (Vesco *et al.*, 2007) e Turquia (Sevegili *et al.*, 2003). No

entando foi inferior à seroprevalência obtida por Bastiaensen e Dorny (1999) e superior à de Mainar *et al.* (1996). As diferenças observadas podem ser devidas à utilização de diferentes técnicas serológicas, à idade dos animais envolvidos no estudo e às diferentes condições climáticas existentes nos vários locais onde foram realizados os estudos (Sawadogo *et al.*, 2005).

Em relação aos factores de risco, os parâmetros que estudamos permitiram-nos retirar associações estatisticamente significativas dos resultados. Em relação ao sexo dos animais, obtivemos uma seroprevalência nos machos de 35,7% e nas fêmeas de 70,0%, esta diferença significativa entre sexos está de acordo com estudos anteriores (van der Puije *et al.*, 2000; Clementino *et al.*, 2007). Van der Puije *et al.* (2000), sugerem que esta diferença, se deve ao facto de os animais do sexo feminino serem mais susceptíveis que os machos à infecção por *T. gondii*.

Observando os resultados obtidos, em comparação com os grupos etários, concluimos que os animais jovens, possuem seroprevalências inferiores (21,1%) em relação aos animais adultos (81,0%). Estes resultados são esperados, uma vez que os animais mais velhos (>1 ano) possuem uma maior probabilidade de exposição à contaminação ambiental por oocistos do parasita, o que aumenta a probabilidade de serem infectados (Bahrieni *et al.*, 2008). Estes resultados são corroborados por outros obtidos em diferentes partes do mundo e com diferentes técnicas (Sevegili *et al.*, 2003; Clementino *et al.*, 2007; Vesco *et al.*, 2007; Bahrieni *et al.*, 2008). Desta forma, a associação entre a seropositividade e a idade demonstra a importância da transmissão horizontal, pela ingestão de oocistos, na infecção em ovinos (Clementino *et al.*, 2007).

Por fim, discutindo os resultados que obtivemos nos ovinos, na relação entre o regime de exploração e a percentagem de seropositivos, verificamos diferença significativa entre os animais criados em regimes de exploração extensiva (77,3%) e semi-intensiva (22,2%).

Skjerve *et al.* (1998) demonstraram que a presença de pastagens perto das explorações dos animais eram um factor de risco para a aquisição da infecção por *T. gondii*. Podemos concluir que as explorações em regime extensivo permitem uma maior liberdade dos animais, além de haver maior probabilidade da existência de gatos, o que pressupõe um aumento esperado nas seroprevalências. Pelo contrário, em explorações

semi-intensivas, existe uma maior restrição no acesso ao exterior, a alimentação dos animais é mais industrial, as medidas de higiene são mais eficazes e existe um maior controle sobre a existência de outros animais nas instalações, o que leva a uma diminuição na percentagem de animais seropositivos.

No estudo que realizámos em suínos o teste serológico utilizado foi o MAT, o qual possui uma elevada sensibilidade e especificidade nestes animais (Dubey, 1997). A prevalência que obtivemos (0%) foi semelhante à de outros estudos (Hivelä-Koski, 1992; Seinek, 1996; Skjerve *et al.*, 1996). Contudo, num estudo realizado em Portugal por Sousa *et al.* (2006), a percentagem de suínos seropositivos foi de 15,6%. Estes animais provinham de pequenas explorações com regimes semi-intensivos, existindo assim uma maior probabilidade de aquisição da infecção devido à contaminação ambiental. Patton *et al.* (1997) concluíram que os animais mantidos em explorações confinadas (regimes intensivos), sem ou com contacto limitado dos suínos com gatos, roedores e aves, têm seroprevalências inferiores. Animais mantidos em regimes semi-intensivos possuem uma maior probabilidade de aquisição da infecção comparativamente aos animais do nosso estudo, que eram provenientes de explorações em regime intensivo.

O risco de adquirir a infecção, também depende das condições de higiene das explorações. Assim sendo, em regimes intensivos, a higiene é maximizada e os animais encontram-se confinados. Esta observação é corroborada por Dubey e Jones (2008) que observaram que em virtude da melhoria das condições de manejo dos animais nos EUA, a seroprevalência da infecção por *T.gondii* tem vindo a diminuir drasticamente.

5. Conclusão

Com o nosso estudo pretendeu-se determinar a seroprevalência da infecção por *T. gondii* em cães, suínos e ovinos, em algumas áreas de Trás-os-Montes e Alto Douro (sub-regiões NUTS III do Alto Trás-os-Montes; Douro e Tâmega) e conseqüentemente determinar os factores de risco associados à infecção de modo a encontrar medidas profiláticas mais eficazes.

Os resultados que obtivemos permitem-nos concluir da existência de contaminação ambiental, da susceptibilidade dos ovinos à infecção, da eficácia do controlo sanitário nos regimes de exploração intensiva de suínos e da seroprevalência moderada existente em cães, um animal de estimação privilegiado pelo ser humano, mas que acarreta preocupações de saúde pública.

Concluimos que ovinos adultos, do sexo feminino e em regimes de exploração extensivas são os mais susceptíveis à infecção, tornando-se vantajoso a introdução de uma vacina anti-*T. gondii*, já existente em alguns países, e um incentivo à melhoria das medidas de controle sanitário existentes em explorações de ovinos em regime extensivo.

Verificamos que a idade é o único factor de risco significativo nos cães, o que sustenta a existência de contaminação ambiental na região. Nos suínos, as seroprevalências têm diminuído com a modernização das explorações pecuárias, o que denota a importância das boas práticas de manejo e a inexistência de roedores e gatos nessas mesmas explorações, características das explorações em regime intensivo, de onde recolhemos as nossas amostras e das quais obtivemos uma seroprevalência de 0%.

O MAT, pela sensibilidade e especificidade elevadas, aliadas ao preço e ao número considerável de amostras que permite testar, demonstra ser um bom teste de referência para o estudo da infecção por *T. gondii* em várias espécies animais.

Existe muito para se explorar acerca da epidemiologia de *T. gondii*. Com este estudo demonstrou-se a necessidade de planejar programas de prevenção e de incentivo à educação para a saúde porque concluimos que na área de Trás-os-Montes e Alto Douro existe o perigo de exposição aos estádios infectantes do parasita e que quanto maior for o período de tempo, maior a probabilidade de aquisição da infecção.

ANEXOS

Anexo I

Seroprevalência de infecção felina por *Toxoplasma gondii* em vários países.

Pais (Cidade)	Seroprevalência	Prova serológica	Referências
Alemanha	45,0%	MAT	Tenter <i>et al.</i> , 1994
Arábia Saudita	30,3%	não especificado	Hossain <i>et al.</i> , 1986
Argentina (Buenos Aires)	19,5%	IHAT	Fernández <i>et al.</i> , 1995
Bélgica (Ghent)	70,2%	MAT	Dorny <i>et al.</i> , 2002
Brasil			
(Estado de São Paulo)	40,8% - 50,9%	DT	Sogorb <i>et al.</i> , 1972; Larsson <i>et al.</i> , 1982
	35,4%	MAT	Pena <i>et al.</i> , 2006
(Estado do Paraná)	84,4%	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2004b
Colômbia	45,2%	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2006
Espanha (Barcelona)	45,0%	MAT	Gauss <i>et al.</i> , 2003
EUA	30,0%	MAT	Lappin, 1996
França	40,0%	MAT	Meunier <i>et al.</i> , 2006
(Lyon)	18,6%	MAT	Afonso <i>et al.</i> , 2006
Itália	33,3%	MAT	D'Amore <i>et al.</i> , 1997
Japão	5,4 %	LAT	Maruyama <i>et al.</i> , 2003
Portugal (Lisboa)	24,2%	MAT	Vaz <i>et al.</i> , 2006
(Porto)	49%	MAT	Pereira, 2006
(Trás-os-Montes)	35,8%	MAT	Lopes, <i>et al.</i> , 2008
República Checa (Brno)	48,7%	DT	Svoboda e Svobodová, 1987
República Popular da China	79,4%	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2007
Suécia	42,0%	ELISA	Uggla <i>et al.</i> , 1990
	45,0%	MAT	Ljungstrom <i>et al.</i> , 1994
Granada/Índias Ocidentais	35,0%	MAT	Asthana <i>et al.</i> , 2006

Anexo II

Seroprevalência de infecção humana por *Toxoplasma gondii* em vários países e grupos populacionais

Pais (Cidade)	Seroprevalência	Grupo estudado	Referências
Bélgica	50%	Mulheres gestantes	Zuber e Jaquier, 1995
Brasil	60%	6-8 anos	Bahia-Oliveira <i>et al.</i> , 2001
(Rondonia)	73,3%	População em geral	Cavalcante <i>et al.</i> , 2006
(São Paulo)	32,4%	<12 anos	Francisco <i>et al.</i> , 2006
Canadá	28%	População em geral	Karin e Trust, 1977;
Estônia (Tartu)	54,9%	População em geral	Birgisdottir <i>et al.</i> , 2006
EUA	10,8-11%	População em geral	Jones <i>et al.</i> , 2007
Islândia (Reykjavik)	9,8%	População em geral	Birgisdottir <i>et al.</i> , 2006
México (Durango)	7,4%	População em geral	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2007
Portugal	47%	População em geral	Ângelo, 1979
	25,6%	População em geral	Machado, 2005
Reino Unido	22%	População em geral	Dubey e Beattie, 1988
Suécia (Uppsala)	23%	População em geral	Birgisdottir <i>et al.</i> , 2006

Anexo III

Seroprevalência de infecção ovina por *Toxoplasma gondii* em vários países.

País (Cidade)	Seroprevalência	Prova serológica	Referências
Áustria	66%	IFAT	Edelhofer, 1994
Brasil (Bahia)	18,6%	LAT	Gondim <i>et al.</i> , 1999
(Lajes)	55,7%	ELISA	Clementino <i>et al.</i> , 2007
Chile	28%	IFAT	Gorman <i>et al.</i> , 1990
Egipto (Cairo)	43,7%	MAT	Shaapan <i>et al.</i> , 2008
Espanha	12%	MAT	Mainar <i>et al.</i> , 1996
	35%	MAT	Marca <i>et al.</i> , 1996
França	92%	IFAT	Cabannes <i>et al.</i> , 1997
Grécia (Creta)	23%	ELISA	Stefanakis <i>et al.</i> , 1995
Irão (Mazandaram)	35%	IFAT	Sharif <i>et al.</i> , 2007
Itália (Sicília)	49,9%	ELISA	Vesco <i>et al.</i> , 2007
Marrocos (Marrakech)	27,6%	ELISA	Sawadogo <i>et al.</i> , 2005
Noruega	3%	ELISA	Skjerve <i>et al.</i> , 1996
Reino Unido	29%	LAT	Samad e Clarkson, 1994
Suriname	67%	MAT	Bastiaensen e Dorny, 1999
Tailândia (Satun)	27,9%	LAT	Jittapalapong <i>et al.</i> , 2005
Turquia			
(Şanlıurfa)	55,7%	DAT	Sevgili <i>et al.</i> , 2003
(Yalova)	65,1%	LAT	Öncel <i>et al.</i> , 2005

Anexo IV

Seroprevalência de infecção canina por *Toxoplasma gondii* em vários países

País (Cidade)	Seroprevalência	Prova serológica	Referências
Argentina	60%	IFAT	Gury, 1995
Brasil	47%	IFAT	Guimarães <i>et al.</i> , 1992
	53%	IFAT	Cabral <i>et al.</i> , 1998
	63%	ELISA	Domingues <i>et al.</i> , 1998
	84%	IFAT	Garcia <i>et al.</i> , 1999
(São Paulo)	51%	IFAT	Varandas <i>et al.</i> , 2001
Chile	12%	IHAT	Gorman <i>et al.</i> , 1991
E.U.A (Kansas)	25%	DAT	Lindsay <i>et al.</i> , 1990
Espanha	47%	IFAT	Di Lorenzo <i>et al.</i> , 1997
França	39%	IFAT	Cabannes <i>et al.</i> , 1998
Itália	17%	IFAT	Bartoli <i>et al.</i> , 1996
Portugal (Porto)	47%	MAT	Pereira, 2007
Sri Lanka	67,4%	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2007
Suécia	30%	DAT	Björkmann <i>et al.</i> , 1994
Trinidad e Tobago	32%	LAT	Ali <i>et al.</i> , 2003
Turquia	85%	IFAT	Çakmak <i>et al.</i> , 1996

Anexo V

Seroprevalência de infecção suína por *Toxoplasma gondii* em vários países.

Pais (Cidade)	Seroprevalência	Prova serológica	Referências
Argentina	37,8%	MAT	Venturini <i>et al.</i> , 2004
Alemanha	0%	ELISA	Seinek, 1996
Brasil	9,6%	ELISA	Suaréz-Aranda <i>et al.</i> , 2008
(São Paulo)	17%	MAT	dos Santos <i>et al.</i> , 2005
Chile	30%	IHAT	Tamayo <i>et al.</i> , 1990
EUA (Illinois)	21%	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 1995a
(Iowa)	22%	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 1995b
Finlândia	3%	ELISA	Hivelä-Koski, 1992
Holanda	2%	ELISA	Knapen <i>et al.</i> , 1995
México	9%	ELISA	García-Vásquez <i>et al.</i> , 1993
Noruega	3%	ELISA	Skjerve <i>et al.</i> , 1996
Panamá	32,1%	IFAT	Correa <i>et al.</i> , 2005
Peru	32,3%	ELISA	Suaréz-Aranda <i>et al.</i> , 2008
Polónia	36%	ELISA	Bartoszcze <i>et al.</i> , 1991
Portugal	15,8%	MAT	Sousa <i>et al.</i> , 2006
(Alentejo)	9,3%	DAT	Ângelo <i>et al.</i> , 2005
Zimbabué	9%	MAT	Pandey e van Knapen, 1992

Anexo VI

Material e reagentes

- a) Placas de microtitulação com o fundo em U (bioMérieux, 2006);

- b) Antígeno toxoplásmico – suspensão de taquizoítos em formol, estirpe de Sabin obtida a partir de líquido ascítico de rato (bioMérieux, 2006);

- c) Solução diluidora do antígeno: tampão albumina – solução tamponada de ácido bórico (BABS) de cor vermelha (pH 8,95) azida sódica 1 g/L (bioMérieux, 2006);

- d) Solução tampão de fosfato (PBS) (bioMérieux, 2006);

- e) 2-beta-mercaptoetanol (2-ME) (14,2 mol/L). Diluir 0,35 ml (2-ME) em PBS q.b.p. 25ml, de modo a obter uma solução com 0,2 mol/L (bioMérieux, 2003);

- f) Soro controlo negativo;

- g) Soro controlo positivo;

- h) Soros problema a testar;

- i) Micropipetas e pontas.

- j) Etiquetas

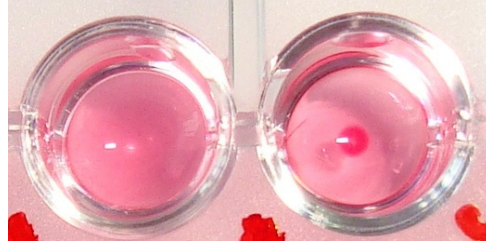
Anexo VII

Leitura e interpretação dos resultados

- Controlo do antigénio: sedimentação dos taquizoítos em botão ou anel (Fotografia 1).
- Controlo soro negativo e positivo (Fotografia 2).

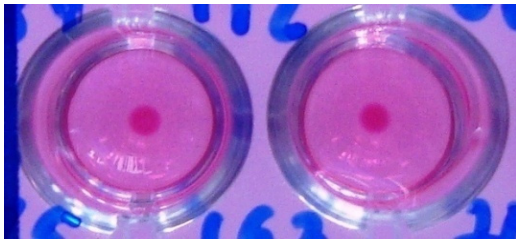


Fotografia 1. Controlo do antigénio (Lopes, 2007b).

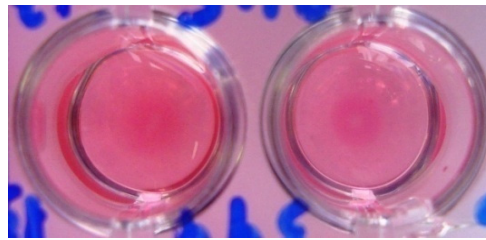


Fotografia 2. Control positivo (à esquerda) e control negativo (à direita).

- Como resultado negativo consideramos a sedimentação dos taquizoítos em botão bem nítido (Fotografia 3) ou em anel com diâmetro inferior a metade do diâmetro da cúpula (Fotografia 4).

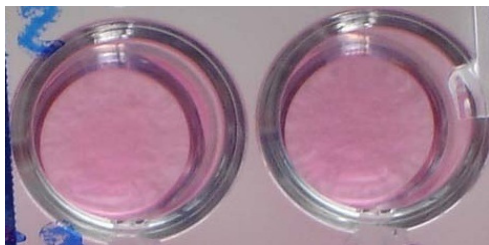


Fotografia 3. Sedimentação dos taquizoítos em botão bem nítido.

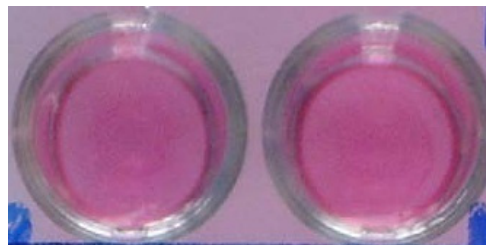


Fotografia 4. Sedimentação dos taquizoítos em diâmetro inferior a metade do diâmetro da cúpula.

- consideramos resultado positivo a presença de aglutinado cobrindo pelo menos metade do fundo da cúpula (Fotografias 5 e 6).



Fotografia 5. Presença de aglutinado cobrindo todo o fundo da cúpula (Lopes, 2007b).



Fotografia 6. Presença de aglutinado cobrindo metade do fundo da cúpula (Lopes, 2007b).

Anexo VIII

Número de animais e distribuição relativa obtidos a partir dos dados do inquérito realizado em cães

	Animais (n)	Distribuição relativa (%)
Sexo		
Machos	116	75,3
Fêmeas	38	24,7
Grupo etário		
Adultos (>12 meses)	104	74,3
Jovens (<12 meses)	36	25,7
Hábitos de Vida		
Acesso ao exterior e ao interior	44	28,6
Vida exclusiva no interior	4	2,6
Vida exclusiva no exterior	106	68,8
Tipo de alojamento		
Casa	150	97,4
Apartamento	4	2,6
Contacto com outros cães		
Sim	120	78,9
Não	32	21,1
Tipo de alimentação		
Comercial	10	6,5
Mista	143	93,5
Deslocações		
Àrea de residência ou sem deslocações	138	89,6
Fora da área de residencia	16	10,4
Vacinado		
Sim	7	4,7
Não	143	95,3
Desparasitado		
Sim	111	73,0
Não	41	27,0

Anexo IX

Número de animais e distribuição relativa obtidos a partir dos dados do inquérito realizado em ovinos

	Animais (n)	Distribuição relativa (%)
Sexo		
Machos	14	41,2
Fêmeas	20	58,8
Grupo etário		
Adultos (>12 meses)	21	52,5
Jovens (<12 meses)	19	47,5
Regime		
Extensivo	22	55,0
Semi-intensivo	18	45,0

Anexo X
~ ESPÉCIES PECUÁRIAS ~

Amostra nº ____ EP /20 ____

Data: ____/____/____

1. Espécie:

Bovino

Caprino

Ovino

Suíno

2. N° de identificação: Marca auricular: _____

Tatuagem: _____

3. Sexo: Masculino Feminino

4. Idade: _____

5. Raça: _____

6. Proveniência do animal:

Distrito: _____ Concelho: _____ Freguesia: _____

7. Identificação da exploração: _____

8. Condições da exploração:

Regime intensivo

Regime semi-intensivo

Regime extensivo

9. Material recolhido:

Sangue (soro) (conservar a 4°C — refrigerado)

Líquido pleural (congelar)

Líquido peritoneal (congelar)

Tecidos/órgãos (cérebro; coração) (congelar)

10. Tipo de abate:

Abate sanitário

Abate normal

11. Carcaça:

Aprovada

Rejeitada Causa: _____

12. Estatuto sanitário: _____

13. Local de abate: _____

Anexo XI

~ CÃES ~

Amostra nº _____ C /20____

Data: ____/____/____

Identificação do proprietário

- Nome: _____
 - Sexo: Masculino Feminino
 - Idade: ____ anos
 - Escolaridade: _____ (facultativo)
 - Endereço: _____
_____ Concelho: _____ Meio urbano Meio rural
 - Contacto: _____
-

Dados relativos ao cão

1. Nome: _____
2. Sexo: Masculino Feminino Castrado: Não Sim
3. Raça: _____
4. Data de nascimento: ____/____/____
5. Pelagem Curta Média Comprida Cor _____
6. O animal encontra-se doente? Não Sim
Com: _____
7. Tem acesso a roedores (ratos, ratazanas, etc), aves? Não Sim
8. Tipo de habitação:
Apartamento Quinta Vivenda c/ jardim Local de reprodução

9. Hábitos de vida:

Vive exclusivamente no exterior Vive exclusivamente dentro de casa

Vive dentro de casa mas tem acesso ao exterior

Alimentação:

Caseira Ração seca Lata

Carnes cruas e/ou mal cozinhadas De que animal? _____

10. Deslocações do animal:

Nenhuma Várias regiões dentro do país Estrangeiro

Área de residência

Outras _____

11. Vacinado? Não Sim

12. Desparasitado? Não Sim Há quanto tempo? _____

Nome do desparasitante: _____

13. Contacta com outros animais? Não Sim Quais? _____

14. O seu cão tem/teve alguma das seguintes doenças:

Esgana Parvovirose Leishmaniose

Não sabe

15. Material recolhido:

Sangue (soro) (conservar a 4°C — refrigerado)

REFERÊNCIAS

- Abreu, C.B.; Navarro, I.T.; Balarin, M.R.; Bracarense, A.P.; Marana, E.R.; Trapp, S.M.; Fuginaka, C.A.; Prudência, L.B.; Matos, M.R.; Tsutsui, V.S. (2001). Clinical, pathological and serologic aspects of experimental toxoplasmosis in young dogs. *Semina Ci Agrárias* **22**: 123-130.
- Afonso, E.; Thulliez, P.; Gilot-Fromont, E. (2006). Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *Int J Parasitol* **36**: 1373-1382.
- Ajzenberg, D.; Bañuls, A.L.; Su, C.; Dumètre, A.; Demar, M.; Carme, B.; Dardé, M.L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **34**: 1185-1196.
- Ali, C.N.; Harris, J.A.; Watkins, J.D.; Adesiyun, A.A. (2003). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Vet Parasitol* **113**: 179-187.
- Ângelo, H.F. (2000). Metodologia de identificação da infecção por *Toxoplasma gondii* no hospedeiro imunocomprometido. Dissertação de doutoramento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.
- Ângelo, M.H. (1979). Prevalência dos anticorpos antitoxoplasmose. Arquivos do Instituto Nacional de Saúde.
- Arrias, M.L.; Chinchilla, M.; Linder, E.; Reyes, L. (1996). Seroepidemiology of toxoplasmosis in human: possible transmission routes in Costa Rica. *Revisit De Bio Trop* **44**: 377-381.
- Asthna, S.P.; Macpherson, C.N.L.; Weiss, S.H.; Stephens, R.; Sharma, R.N.; Dubey, J.P. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and cats in Grenada, West Indies. *J Parasitol* **92**: 644-645.
- Azevedo, S.S.; Batista, C.S.A.; Vasconcelos, S.A.; Aguiar, D.M.; Ragozo, A.M.A.; Rodrigues, A.A.R.; Alves, C.J.; Gennari, S.M. (2005). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res Vet Sci* **79**: 51-56.
- Bahia-Oliveira, L.M.G.; Wilken de Abreu, A.M.; Azevedo-Silva, J. (2001). Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. *Int J Parasitol* **31**: 133-136.
- Bahrieni, M.; Harandi, M.F.; beigzadeh, M.; Kamyabi, H.; Zia-Ali, N. (2008). Risk factors analysis associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in southeastern Iran using modified agglutination test (MAT). *Iranian J Parasitol* **3**: 38-43.
- Barragan, A.; Sibley, L.D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol* **11**: 426-430.
- Bartoli, M.; Nacca, A.; Licciardi, V.; Veneziano, V.; Cringoli, G. (1996). Anticorpi verso *Toxoplasma gondii* in cani e gatti della provincia di Benevento. *Acta Med Vet* **42**:191-196.
- Bartoszcze, M.; Krupa, K.; Roszkowski, J. (1991). ELISA for assessing *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. *J Vet Med B* **38**: 263-264.
- Bastiaensen, P.; Dorny, P. (1999). Ovine toxoplasmosis in Suriname and its possible impact on human infection. *Tropicicultura* **16-17**:18-20.
- Bhopale, G.M. (2003). Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**: 213-222.
- bioMérieux. (2006). Toxo-Screen® DA. Refⁿ 75 481. 02035 G-PT-2006/02. bioMérieux, Lyon, pp. 1-5.

- Birgisdottir, A.; Asbjornsdottir, H.; Cook, E.; Gislason, D.; Jansson, C.; Olafsson, I.; Gislason, T.; Jogi, R.; Thlodleifsson, B. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Sweden, Estonia and Iceland. *Scand J Infect Dis* **38**: 625-631.
- Björkman, C.; Lunden, A.; Uggla, A. (1994). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. *Acta Vet Scand* **35**: 445-457.
- Blewett, D.A.; Miller, J.K.; Buxton, D. (1982). Response of immune and susceptible ewes to infection with *Toxoplasma gondii*. *Vet Rec* **111**: 175-177.
- Blewett, D.A.; Trees, A.J. (1987). The epidemiology of ovine toxoplasmosis with especial respect to control. *Br Vet J* **143**: 128-135.
- Buxton, D. (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* **29**: 289-310.
- Buxton, D.; Innes, E.A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* **110** (Suppl 1):1-16.
- Buxton, D.; Maley, S.W.; Pastoret, P.P.; Brochier, B.; Innes, E.A. (1997). Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet Rec* **141**: 308-309.
- Buxton, D.; Maley, S.W.; Wright, S.E.; Rodger, S.; Bartley, P.; Innes, E. A. (2007). *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. *Vet Parasitol* **149**: 25-28.
- Cabannes, A.; Lucchese, F.; Pelse, H. (1998). La prevalence de la toxoplasmose chez les animaux familiers dans le sud-ouest de la France. *Meat Mal Infect* **28**: 647-651.
- Cabral, D.D.; Silva, D.A.O.; Mineo, J.R.; Ferreira, F.A.; Duran, F.P. (1998). Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Uberlandia-MG. *Rev Bras Parasitol Vet* **7**: 87-90.
- Cakmak, A.; Karaer, Z.; Biyikoglu, G.; Babur, C.; Piskin, F.C. (1996). Ankara'da sokak köpeklerinde tokzoplazmozisin seroprevalansı. *FÜ Sag Bil Derg* **10**: 279-282.
- Canon-Franco, W.A.; Bergamaschi, D.P.; Labruna, M.B.; Camargo, L.M.A.; Silva, J.C.R.; Pinter, A.; Gennari, S.M. (2004). Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. *Vet Res Commun* **28**: 113-118.
- Carruthers, V.B.; Suzuki, I. (2007). Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the Brain. *Schizophr Bull* **33**: 745-751.
- Carvalho, F.R. (2006). Avaliação de anticorpos monoclonais reativos aos antígenos P30, P22 e P97 de *Toxoplasma gondii*, em ensaio imunoenzimático reverso, utilizados na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA para o sorodiagnóstico da toxoplasmose humana. *Dissertação de mestrado*. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.
- Cavalcante, G.T.; Aguilar, D.M.; Chiebao, D.; Dubey, J.P.; Ruiz, V.L.; Dias, R.A.; Camargo, L.M.; Labruna, M.B.; Gennari, S.M. (2006a). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural Western Amazon, Brazil. *J Parasitol* **92**: 863-864.
- Cheadle, M.A.; Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L. (1999). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet Parasitol* **85**: 325-330.
- Childs, J.E.; Seegar, W.S. (1986). Epidemiologic observations on infection with *Toxoplasma gondii* in three species of urban mammals from Baltimore, Maryland. USA. *Int J Zoonoses* **13**: 249-261.
- Choi, W.Y.; Nam, H.W.; Kwak, N.H.; Huh, W.; Kim, Y.R.; Kang, M.W.; Cho, S.Y.; Dubey, J.P. (1997). Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis* **175**: 1280-1282.

- Clementino, M.M.; Souza, M.F.; Neto, V.F. (2007). Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. *Vet Parasitol* **146**: 199-203.
- Contreras, M.D.; Sandoval, M.L.; Salinas, P.; Muñoz, P.; Vargas, S. (2000). Utilidad diagnóstica de ELISA IgG/IgM/IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crônica. *Bol Chil Parasitol* **55**: 1-10.
- Cordero-del-Campillo, M.; Rojo-Vázquez, F.A. (eds) (1999). Parasitología veterinaria. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 968 pp.
- Correa, R.; Cedño, I.; Escobar, C.; Fuentes, I. (2008). Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. *Vet Parasitol* **153**: 9-11.
- Coutinho, A.M.P.; Monteiro, M.H.; Mira, J.C.; Ângelo, H. (2005). Determinação da prevalência de Toxoplasmose em suínos, na Região do Alentejo. *RPCV SUPL* **129-130**: 1-17.
- D'Amore, E.; Falcone, E.; Busani, L.; Tollis, M. (1997). A serological survey of Feline Immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. *Vet Res Commun* **21**: 355-359.
- da Silva, A.V.; Langoni, H. (2001). The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol* **97**: 191-198.
- Davidson, M.G. Toxoplasmosis. (2000). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **30**: 1051-1062.
- Denkers, E.Y.; Gazzinelli, R.T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Reviews* **11**: 569-588.
- Desmots, G.; Remington, J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* **11**: 562-568.
- Di Lorenzo, C.; Venturini, C.; Castellano, C.; Venturini, L.; Unzaga, J.M.; Bacigalupe, D. (1997). Detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* y anti-*Toxoplasma gondii* en perros de area urbana. *Rev Med Vet (Buenos Aires)* **78**: 325-326.
- Domingues, L.M.; Machado, R.Z.; Costa, M.T.; Carvalho, C.S.; Costa, A.J.; Malheiros, E.B. (1998). Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF). *Rev Bras Parasitol Vet* **7**: 79-85.
- Dorny, P.; Speybroeck, N.; Verstraete, S.; Baeke, M.; De Becker, A.; Berkvens, D.; Vercruyse, J. (2002). Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *Vet Rec* **151**: 626-629.
- Dubey, J.P. (1984). Experimental toxoplasmosis in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int. Goat Sheep Res* **2**: 93-104.
- Dubey, J.P. (1987). Toxoplasmosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **17**: 1389-1404.
- Dubey, J.P. (1996). Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol* **64**: 65-70.
- Dubey, J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **28**: 1019-1024.
- Dubey, J.P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* **84**: 349-367.
- Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* **126**: 57-72.

- Dubey, J.P.; Weigel, R.M.; Siegel, A.M.; Thulliez, P.; Kitron, U.D.; Mitchell, M.A.; Mannelli, A.; Mateus-Pinilla, N.E.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.H.; Todd, K.S. (1995a). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol* **81**: 723-729.
- Dubey, J.P.; Beattie, C.P. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, (FL): CRC Press.
- Dubey, J.P.; Carpenter, J.L.; Speer, C.A.; Topper, M.J.; Uggla, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* **192**: 1269-1285.
- Dubey, J.P.; Desmonts, G. (1987). Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet J* **19**: 337-339.
- Dubey, J.P.; Frenkel, J.K. (1972). A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of cats. *J Parasitol* **58**: 1005-1006.
- Dubey, J.P.; Hoover, E.A.; Walls, K.W. (1977). Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. *J Protozool* **24**: 184-186.
- Dubey, J.P.; Jones, J.L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States, *Int J Parasitol* doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.007.
- Dubey, J.P.; Lappin, M.R. (1998). Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene C. E. (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, pp. 493-503.
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* **11**: 267-299.
- Dubey, J.P.; Mattix, M.E.; Lipscomb, T.P. (1996). Lesions of neonatally induced toxoplasmosis in cats. *Vet Pathol* **33**: 290-295.
- Dubey, J.P.; Navarro, I.T.; Sreekumar, C.; Dahl, E.; Freire, R.L.; Kawabata, H.H.; Vianna, M.C.B.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Thulliez, P.; Lehmann, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol* **90**: 721-726.
- Dubey, J.P.; Rajapakse, R.P.V.J.; Wijesundera, R.R.M.K.K.; Sundar, N.; Velmurugan, G.V.; Kwok, O.C.H.; Su, C. (2007). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Sri Lanka and genetic characterization of the parasite isolates. *Vet Parasitol* **146**: 341-346.
- Dubey, J.P.; Rollor, E.A.; Smith, K.; Kwok, O.C.; Thulliez, P. (1997). Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. *J Parasitol* **83**: 839-841.
- Dubey, J.P.; Sharma, S.P. (1980). Parasitaemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* **66**: 111-114.
- Dubey, J.P.; Su, C.; Cortés, J.A.; Sundar, N.; Gomez-Marin, J.E.; Polo, L.J.; Zambrano, L.; Mora, L.E.; Lora, F.; Jimenez, J.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Zhang, X.; Nieto, A.; Thulliez, P. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet Parasitol* **141**: 42-47.
- Dubey, J.P.; Su, C.; Cortés, J.A.; Sundar, N.; Gomez-Marin, J.E.; Polo, L.J.; Zambrano, L.; Mora, L.E.; Lora, F.; Jimenez, J.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Zhang, J.; Nieto, A.; Thulliez, P. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet Parasitol* **141**: 42-47.

- Dubey, J.P.; Sundar, N.; Hill, D.; Velmurugan, G.V.; Bandini, L.A.; Kwok, O.C.H.; Majundar, D.; Su, C. (2008). High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol* doi:10.1016/j.ijpara.2007.11.012.
- Dubey, J.P.; Thulliez, P.; Poweli, E.C. (1995b). *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparisons of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J Parasitol* **81**: 48-53.
- Dubey, J.P.; Weigel, R.M.; Siegel, A.M.; Thulliez, P.; Kitron, U.D.; Mitchell, M.A.; Mannelli, A.; Mateus-Pinilla, N.E.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.H.; Todd, K.S. (1995). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol* **81**: 723-729.
- Dubey, J.P.; Weisbrode, S.E.; Sharma, S.P.; Al-Khalidi, N.W.; Zimmerman, J.L.; Gaafar, S.M. (1979). Porcine toxoplasmosis in Indiana. *J Am Vet Med Assoc* **173**: 604-609.
- Edelhofer, R. (1994). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria an evaluation of data from 1982 and 1992. *Parasitol Res* **80**: 642-644.
- Esteban-Redondo, I.; Innes, E.A. (1997). *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **20**(2):191-6.
- Esteban-Redondo, I.; Maley, S.W.; Thomson, K.; Nicoll, S.; Wright, S.; Buxton, D.; Innes, E.A. (1999). Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet Parasitol* **86**:155-171.
- Farrell, R.L.; Docton, F.L.; Chamberlain, D.M.; Cole, C.R. (1952). Toxoplasmosis. I. *Toxoplasma* isolated from swine. *Am J Vet Res* **13**: 181-184.
- Faull, W.B.; Clarkson, M.J.; Winter, A.C. (1986). Toxoplasmosis in a flock of sheep: some investigations into its source and control. *Vet Rec* **119**: 491-493.
- Fernández, F.; Ouviaña, G.; Clot, E.; Guido, R.F.; Codoni, C. (1995). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina, 1993. *Vet Parasitol* **59**: 75-79.
- Francisco, F.M.; Souza, S.L.P.; Gennari, S.M.; Pinheiro, S.R.; Muradian, V.; Soares, R.M. (2006). Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the São Paulo municipality, SP Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **48**(3):167-170.
- Fusco, G.; Rinaldi, L.; Guarino, A.; Proroga, Y.T.R.; Pesce, A.; Giuseppina, D.M.; Cringoli, G. (2007). *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Vet Parasitol* **149**: 271-274.
- Gajadhar, A.A.; Aramini, J.J.; Tiffin, G.; Bisailon, J.R. (1998). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian market-age pigs. *J Parasitol* **84**:759-763.
- Garcia, J.L.; Navarro, I.T.; Ogawa, L.; Kobilka, F.; (1999). Soroprevalencia epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na area rural de Jaguapita (Parana), Brasil. *Rev Panam Salud Publica* **6**: 157-163.
- Garcia, L.J.; Gennari, S.M.; Navarro, I.T.; Machado, R.Z.; Headley, S.A.; Vidotto, O.; Junior, J.S.G.; Bugni, F.M.; Igarashi, M. (2008). Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Res Vet Sci* **84**: 237-242.
- Gauss, C.B.L.; Almería, S.; Ortuño, A.; Garcia, F.; Dubey, J.P. (2003). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. *J Parasitol* **89**: 1067-1068.

- Gauss, C.B.L.; Dubey, J.P.; Vidal, D.; Ruiz-Fons, F.; Vicente, J.; Marco, I.; Lavin, S.; Gortazar, C.; Almeri'a, S. (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet Parasitol* **131**: 151-156.
- Gazzinelli, R. T.; Hieny, S.; Wynn, T.; Wolf, S.; Sher, A. (1993). IL-12 is required for the T-cell independent induction of IFN-g by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6115-6119.
- Gorman, T.; Garcia, M.; Lorca, M. (1991). Infeccion por *Toxoplasma gondii* y *Trichinella spiralis* en perros de la comuna de San Bernardo, Santiago. *Parasitol Dia* **15**: 49-51.
- Guimarães, A.M.; Ribeiro, M.F.B.; Lima, J.D. (1992). Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec* **44**: 67-68.
- Gury Dohmen, F.E. (1995). Toxoplasmosis en perros y gatos de Buenos Aires. *Rev Med Vet* **76**: 65-68.
- Hartley, W.J.; Moyle, G.G. (1974). Further observations on the epidemiology of ovine toxoplasma infection. *Aust J Exp Biol Med Sci* **52**: 647-653.
- Hartley, W.J.; Jebson, J.L.; McFarlane, D. (1954). New Zealand type II abortion in ewes. *Aust Vet J* **30**: 216-218.
- Hartley, W.J.; Marshall, S.C. (1957). Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *N Z Vet J* **5**: 119-124.
- Hegab, S.M.; Al-Mutawa, S.A. (2003). Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin Exp Med* **3**: 84-105.
- Hill, D.; Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* **8**: 634-640.
- Hill, D.; Sreekumar, C.; Jones, J.; Dubey, J.P.; Simjee, S. (2007). Foodborn diseases. Humana press, pp. 337-354.
- Hirvela-Koski, V. (1992). The prevalence of *Toxoplasma* antibodies in swine sera in Finland. *Acta Vet Scand* **33**: 21-26.
- Hossain, A.; Bolbol, A.S.; Bakir, T.M.; Bashandi, A.M. (1986). A serological survey of the prevalence of *Toxoplasma* antibodies in dogs and cats in Saudi Arabia. *Trop Geogr Med* **38**: 244-245.
- Jacobs, L.; Lande, M.N. (1957). A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol* **43**: 308-314.
- Jittapalapong, S.; Sangvaranond, A.; Pinyopanuwat, N.; Chimnoi, W.; Khachaeram, W.; Koizumi, S.; Maruyama, S. (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province. *Thailand Vet Parasitol* **127**: 17-22.
- Jones, J.L.; Kruszon-Moran, D.; Wilson, M.; McQuillan, G.; Navin, T.; McAuley, J.B. (2001). *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol* **154**: 357-365.
- Karim, K.A.; Trust, T.J. (1977). Toxoplasmosis in Greater Victoria. *Can Med Assoc J* **117**: 895-899.
- Kijlstra, A.; Eissen, O.A.; Cornelissen, J.; Munniksmá, K.; Eijck, I.; Kortbeek, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animalfriendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 3165-3169.
- Klun, I.; Djurkovic-Djakovic, O.; Katic-Radivojevic, S.; Nikolic, A. (2006). Cross-seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol* **135**: 121-131.
- Lappalainen, M.; Hedman, K. (2004). Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanità*. **40(1)**: 81-88.

- Lappin, M.R. (1996). Feline toxoplasmosis: interpretation of diagnostic test results. *Semin Vet Med Surg (Small Animal)* **11**: 154-160.
- Larsson, C.E.; Jamra, L.M.F.; Ribeiro, M.F. (1982). Prevalência de toxoplasmose felina determinada pela reacção de Sabin Feldman, em São Paulo. *XXXVII Conferência Anual de Sociedade Paulista de Medicina Veterinária*.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Deroux, G.; Grain J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R.; Lom, J.; Lynn.; Merinfeld, E.G.; Page F.C.; Pljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J.; Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of the *Protozoa*. *J Protozool* **27**: 37-58.
- Lindsay, D.S.; Dubey, J.P.; Butler, J.M.; Blagburn, B.L. (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol* **73**: 27-33.
- Lindsay, D.S.; Dubey, J.P.; Upton, S.J.; Ridley, R.K. (1990). Serological prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Kansas. *J Parasitol* **57**: 86-88.
- Ljungstrom, B.L.; Lúnden, A.; Hoglund, J.; Zakrisson, G. (1994). Evaluation of a direct agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cat, pig and sheep sera. *Acta Vet Scand* **35**: 213-216.
- Lopes, A. P. (2007a). Estudo da infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos da região de Trás-os-Montes e Alto Douro. *Relatório de aula teórico-prática*. UTAD.
- Lopes, A.P. (2007b). Detecção de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* pelo teste de aglutinação directa modificado em soro de gato. *Relatório de uma Aula Prática*. UTAD.
- Lopes, A.P.; Cardoso, L.; Rodrigues, M. (2008). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Vet Parasitol* **155**: 184-189.
- Mainar, R.C.; de la Cruz, C.; Asensio, A.; Dominguez, L.; Vazquez-Boland, J.A. (1996). Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. *Vet Res Commun* **20**: 153-159.
- Marca, M.C.; Ramos, J.J.; Loste, A.; Fernández, A.; Hernández, M. (1996). Prevalencia de toxoplasmosis ovina en la provincia of Zaragoza. *Med Vet* **13**:503-509.
- Maruyama, S.; Kabeya, H.; Nakao, R.; Tanaka, S.; Sakai, T.; Katsube, Y.; Mikami, T. (2003). Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiol Immunol* **47**: 147-153.
- Mateus-Pinilla, N.E.; Dubey, J.P.; Choromanski, L.; Weigel, R.M. (1999). A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *J Parasitol* **85**: 855-860.
- Mcallister, M.M. (2005). A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical" toxoplasmosis. *Vet Parasitol* **132**: 241-247.
- Meerburg, B.G.; Riel, J.W., Cornelissen, J.B.; Kijlstra, A.; Mul, M.F. (2006). Identification of explanatory farm management factors for occurrence of *Toxoplasma gondii* in pigs. *Vector Borne Zoonotic Dis* **6**: 266-274.
- Meunier, V.; Jourda, S.; Deville, M.; Guillot, J. (2006). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in serum and aqueous humor samples from cats with uveitis or systemic diseases in France. *Vet Parasitol* **138**: 362-365.
- Montoya, J.G.; Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis *Lancet* **363**: 1965-1976.
- Morley, E.K.; Williams, R.H.; Hughes, J.M.; Terry, R.S.; Duncanson, P.; Hide, G. (2005). Significant familial differences in the frequency of abortion and

- Toxoplasma gondii* infection within a flock of *Charollais* sheep. *Parasitol* **131**: 181-185.
- Nicolle, C.; Manceaux, L. (1908). Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci* **147**: 763-766.
- Öncel, T.; Vural, G.; Barbür, C.; Kiliç, S. (2005). Detection of *Toxoplasma gondii* seropositivity in sheep in Yalova by Sabin Feldman dye test and latex agglutination test. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* **29 (1)**: 10-12.
- Pandey, V.S.; Van Knapen, F. (1992). The seroprevalence of toxoplasmosis in sheep, goats and pigs in Zimbabwe. *Ann Trop Med Parasitol* **86**: 313-315.
- Patton, S.; Zimmerman, J.; Roberts, T.; Faulkner, C.; Diderrich, V.; Assadi-Rad, A.; Davies, P.; Kliebenstein, J. (1996). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in hogs in the National Animal Health Monitoring System (NAHMS). *J Eucaryot Microbiol* **43**: 1215.
- Pena, H.F.J.; Soares, R.M.; Amaku, M.; Dubey, J.P.; Gennari, S.M. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res Vet Sci* **81**: 58-67.
- Pereira, A.M.M.S. (2006). Contaminação ambiental por *Toxoplasma gondii* na cidade do Porto. Mestrado em saúde pública. Universidade do Porto.
- Plant, J.W.; Richardson, N.; Moyle, G.G. (1974). *Toxoplasma* infection and abortion in sheep associated with feeding of grain contaminated with cat faeces. *Aust Vet J* **50**: 19-21.
- Powell, C.C.; Brewer, M.; Lappin, M.R. (2001). Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Parasitol* **102**: 29-33.
- Reid, H.W.; Buxton, D.; Gardiner, A.C.; Pow, I.; Finlayson, J.; MacLean, M.J. (1982). Immunosuppression in toxoplasmosis: studies in lambs and sheep infected with Louping-ill virus. *J Comp Pathol* **92**: 181-190.
- Remington, J.S.; Macleod, R.; Desmonts, G. (1994). Toxoplasmosis. In: Remington, J.; Klein, J. Infectious diseases of the new-born and infant. 4. Ed., Philadelphia: WB Saunders.
- Rodger, S.M.; Maley, S.W.; Wright, S.E.; Mackellar, A.; Wesley, F.; Sales, J.; Buxton, D. (2006). Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep. *Vet Rec* **159**: 768-771.
- Rodrigues, I.M.X. (2006). Diagnóstico pós-natal da toxoplasmose congênita através da detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii*. Dissertação de mestrado. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.
- Ronday, M.J.; Ongkosuwito, J.V.; Rothova, A.; Kijlstra, A. (1999). Intraocular anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody production in patients with ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* **127**: 294-300.
- Sabin, A.; Feldman, H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of anil immunity phenomenon affecting a protozoan parasitic (*Toxoplasma*). *Science*, Washington DC, v.108, pp. 660-663.
- Samad, M.A.; Clarkson, M.J. (1994). Seroconversion to natural *Toxoplasma gondii* infection during reproductive cycle and its effect on reproduction in sheep. *Bangladesh Vet J* **28**:1-6.
- Savio, E.; Nieto, A. (1995). Ovine toxoplasmosis: seroconversion during pregnancy and lamb birth rate in Uruguayan sheep ocks. *Vet Parasitol* **60**: 241-248.

- Sawadogo, P.; Hafid, J.; Bellete, B.; Sung, R.T.M.; Chakdi, M.; Flori, P.; Raberin, H.; Hamouni, I.B.; Chait, A.; Dalal, A. (2005). Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. *Vet Parasitol* **130**: 89-92.
- Seineke, P. (1996). Seropraèvalenz von antikoèrpern gegen *Toxoplasma gondii* bei Schafen, Ziegen und Schweinen in Niedersachsen. Thesis, *Dr vet med*, Hannover.
- Sevegili, M.; Babür, C.; Nalbantođlu, S.; Karaş, G.; Vatansever, Z. (2003). Determination of Seropositivity for *Toxoplasma gondii* in Sheep in PanlÝurfa Province. *Turk J Vet Anim Sci* **29**: 107-111.
- Shaapan, R.M.; El-Nawawi, F.A.; Tawfik, M.A.A. (2008). Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet Parasitol* **153**: 359-362.
- Sharif, M.; Daryani, A.; Nasrolahei, M.; Ziapour, S.P. (2008). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats in Sari, northern Iran. *Trop Anim Health Prod* **doi**: 10.1007/s11250-008-9173-y.
- Sibley, L.D. (2003). Recent origins among ancient parasites. *Vet Parasitol* **115**:185-198.
- Sibley, L.D.; Boothroyd, J.C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* **359**: 82-85.
- Silva, J.C.; Ogassawara, S.; Adania, C.H.; Ferreira, F.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Ferreira-Neto, J.S. (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Vet Parasitol* **102**: 217-224.
- Skjerve, E., Waldeland, H., Nesbakken, T., Kapperud, G. (1998). Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev Vet Med* **35**: 219-227.
- Sogorb, F.; Jamra, L.F.; Guimarães, E.C.; Deane, M.P. (1972). Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. *Vet Inst Med Trop S Paulo* **14**: 314-320.
- Sousa, S.; Ajzenberg, D.; Canada, N.; Freire, L.; Correia da Costa, J.M.; Dardé, M.L.; Thulliez, P.; Dubey, J.P. (2006). Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol* **135**: 133-136.
- Stefanakis, A.; Bizake, A.; Krambovitis, E. (1995). Seroprevalence of toxoplasmosis in the sheep and goats of Crete, Greece. *Bull Hell Vet Med Soc* **46**: 243-249.
- Steuber, S.; Niu, A.; Bauer, C.; Reetz, J.; Roth, A.; Janitschke, K. (1995). Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of ovine abortion using the polymerase chain reaction. *Deutsch Tierarztliche Wochenschrift* **102**: 91-93.
- Svoboda, M.; Svobodová, V. (1987). Effects of breed, sex, age, management and nutrition on the incidence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs and cats. *Acta Vet Brno* **56**: 315-330.
- Switaj, K.; Master, A.; Skrzypczak, M.; Zaborowski, P.(2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect*. **11**: 170.
- Tamarin, R.H. (2002). Principles of Genetics, 7th Edition. International Edition. Ed. McGraw Hill, New York, USA, pp. 609.
- Tamayo, R.; Contreras, M. del C.; Mendez, M.; Castro, M. (1990). Toxoplasmosis en cerdos beneficiados en las plantas faenadoras de Temuco y Valdivia, Chile. *Arch Med Vet* **22**: 95-99.
- Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* **30**: 1217-1258.

- Tenter, A.M.; Vietmeyer, C.; Johnson, A.M.; Janitschke, K.; Rommel, M.; Lehmacher, W. (1994). ELISAs based on recombinant antigens for seroepidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infections in cats. *Parasitol* **109**: 29-36.
- Tenter, A.M.; Vietmeyer, C.; Johnson, A.M.; Janitschke, K.; Rommel, M.; Lehmacher, W. (1994). ELISAs based on recombinant antigens for seroepidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infections in cats. *Parasitol* **109**: 29-36.
- Thrusfield, M. (1995). *Veterinary Epidemiology*, 2nd ed. Oxford: Blackwell, pp. 483.
- Uggla, A.; Mattson, S.; Juntti, N. (1990). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. *Acta Vet Scand* **31**: 219-222.
- Van der Puije, W.N.A.; Bosompem, K.M.; Canacoo, E.A.; Wastling, J.M.; Akanmori, B.D. (2000). The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. *Acta Trop* **76**: 21-26.
- Varandas, N.P.; Rached, P.A.; Costa, G.H.N.; Souza, L.M.; Castagnolli, K.C.; Costa, A.J. (2001). Frequency of antibodies for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs in northeast of São Paulo State. *Semina: Ci. Agrárias, Londrina* **22**: 105-111.
- Vaz, Y.; Duarte, A.; Pereira da Fonseca, I.; Madeira de Carvalho, L.; Meireles, J.; Fazendeiro, M.I.; Almeida, V. (2006). Important diseases in stray and feral cats in the metropolitan area of Lisbon, Portugal. *Austrália: ISVEE* **11**: 186.
- Vesco, G.; Buffolano, W.; La Chiusa, S.; Mancuso, G.; Caracappa, S.; Chianca, A.; Villari, S.; Curro, V.; Liga, F.; Petersen, E. (2007). *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet Parasitol* **146**: 3-8.
- Wastling, J.M.; Nicoll, S.; Buxton, D. (1993). Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J Med Microbiol* **38**: 360-365.
- Watson, W.A.; Beverley, J.K.A. (1971). Epizootics of toxoplasmosis causing ovine abortion. *Vet Rec* **88**: 120-124.
- Weissenböck, H.; Dubey, J. P. (1993) Toxoplasmosis epizootic in a fattening swine herd. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **100**: 370-374.
- Zuber, P.; Jaquier, P. (1995). Epidemiology of toxoplasmosis: worldwide status. *Schweiz Med Wochenschr* **65** (Suppl): 19-22.