

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL - MCA

FRANCINE BRAGAGNOLO LIZ STEFEN SAKATA

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA *Toxoplasma gondii*
EM OVINOS NO MUNICÍPIO DE LAGES, SANTA CATARINA,
BRASIL.

LAGES, SC

2010

FRANCINE BRAGAGNOLO LIZ STEFEN SAKATA

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA *Toxoplasma gondii*
EM OVINOS NO MUNICÍPIO DE LAGES, SANTA CATARINA,
BRASIL.**

Dissertação apresentada à coordenação do
Curso de Pós Graduação em Ciência Animal,
como requisito para a obtenção do título de
Mestre.

Orientador: PhD. Valdomiro Bellato

LAGES, SC

2010

FRANCINE BRAGAGNOLO LIZ STEFEN SAKATA

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA *Toxoplasma gondii* EM
OVINOS NO MUNICÍPIO DE LAGES, SANTA CATARINA, BRASIL.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre no Curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. PhD. Valdomiro Bellato
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:

Prof^a. Dr^a. Silvia Cristina Osaki
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Membro:

Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:

Prof^a. PhD. Amélia Aparecida Sartor
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, SC, 09 de agosto de 2010

*Dedico este trabalho:
Para meus pais,
Antônio Carlos e Marileide.
Para meu avô,
Octávio.
Para meu marido,
Ricardo.
Para minha filha,
Sofia.
“Fundamental é mesmo o amor,
é impossível ser feliz sozinho...”
(Tom Jobim)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter colocado pessoas especiais no meu caminho e por ter me dado força de vontade para a conclusão deste trabalho.

À minha família, minha fortaleza, meu esteio, por TUDO! Aos meus pais, Antônio Carlos e Marileide, pela base, amor, apoio em todas as horas, dignidade, respeito e por servirem como referências para a minha vida. Aos meus irmãos Márcio e Ricardo, pelo companheirismo, torcida e incentivo. Ao meu avô Octávio e à minha avó Sibila (in memoriam), exemplos de luta, trabalho, amor e fé. Ao meu esposo Ricardo, pela paciência, por compreender minha ausência e pelo auxílio nas coletas. À minha filha Sofia, minha companheirinha, por me tornar a mãe mais orgulhosa e feliz desse mundo.

À Juliana, pequena bolsista e grande colaboradora na realização deste trabalho. Coletas, processamento das amostras, RIFI, relatórios, ELISA, UEL, planilhas... sempre ao meu lado. Gratidão eterna!

Ao Jossemir e ao Leonardo, que voluntária e alegremente não perdiam uma coleta.

Aos meus amigos do coração Eloá e Felipe, por fazerem parte da minha vida e por não me permitirem desanimar.

Meus agradecimentos à Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Mestrado em Ciência Animal, na pessoa do professor Miletto, Coordenador do curso, pelo apoio e incentivo.

Ao professor Bellato, pela paciência, dedicação e orientação prestada a este trabalho.

Aos professores Anderson, Amélia, Antonio e Rosiléia, pelas importantes sugestões na elaboração da dissertação.

À Universidade Estadual de Londrina, ao professor João Luis Garcia e à Elizabete Regina Marangoni Marana, que nos disponibilizaram material, equipamentos, ensinamentos valiosos e nos permitiram o acompanhamento das técnicas diagnósticas.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

Com os objetivos de estimar a prevalência de ovinos portadores de *Toxoplasma gondii* no município de Lages, Santa Catarina, Brasil, e de identificar possíveis fatores de risco para a infecção, foi coletado sangue por punção da veia jugular externa de 360 animais, de 13 propriedades, armazenado em tubos estéreis e transportado ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias CAV/UEDESC, para posterior processamento. Cada criador respondeu a um questionário com dados da propriedade e individuais de cada animal para permitir a identificação dos fatores de risco da infecção. A pesquisa de anticorpos foi realizada por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando como ponto de corte a titulação 1:64 e do Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). Em 100% das propriedades foram encontrados animais positivos. Pela RIFI, 205 (56,94%) ovinos apresentaram anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e pelo ELISA, 153 (42,50%). Considerando-se as técnicas sorológicas e a análise estatística, foram fatores de risco pelo ELISA: a idade, a fonte de água e a categoria animal; e pela RIFI, o tipo racial. Foi constatada sensibilidade de 61%, especificidade de 82% e concordância Kappa de 0,7 entre o ELISA e a RIFI (1:64), considerada boa, permitindo indicar o ELISA como técnica adequada para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii* na espécie ovina.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, ovinos, RIFI, ELISA, fatores de risco.

ABSTRACT

This study evaluated the prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep in the municipality of Lages, in the state of Santa Catarina, Brazil, and identified possible risk factors for infection. Blood samples of 360 animals from 13 properties were collected by puncturing of the jugular vein, stored in sterile tubes and carried to the Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases CAV / UDESC, for later processing. Each creator answered a questionnaire with data of the propertie and each individual animal for identification of risk factors for infection. Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) where serum samples were considered positive at dilutions $\geq 1:64$ and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) were used to detect IgG anti *Toxoplasma gondii* antibodies. 100% of properties were found positive animals. By IFA, 205 (56.94%) sheep had antibodies against *Toxoplasma gondii* and by ELISA, 153 (42.50%) sheep were positive. Considering the serological techniques and statistical analysis, were risk factors by ELISA: the age, the water source and the animal category; and by IFA, the racial type. It has been found sensitivity of 61%, specificity of 82% and Kappa of 0.7 between the ELISA and the IFA (1:64), considered good, allowing to indicate the ELISA as technique adjusted for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* in the ovina species.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, sheep, IFA, ELISA, risk factors.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados obtidos por meio de RIFI ($\geq 1:64$), na pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos, no município de Lages, SC, no período de agosto de 2008 a julho de 2009, por variável analisada e total. 34
- Tabela 2 - Resultados obtidos por meio de ELISA, na pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos, no município de Lages, SC, no período de agosto de 2008 a julho de 2009, por variável analisada e total. 35
- Tabela 3 - Valores utilizados para avaliação da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo, (VPN), concordância Kappa e eficácia do ELISA utilizando como reação de referência a RIFI (1:64) em 360 soros ovinos no município de Lages, SC, Brasil. 40

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
INTRODUÇÃO	9
1 REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	11
1.2 O PARASITO	12
1.3 CICLO BIOLÓGICO	13
1.4 TOXOPLASMOSE EM HUMANOS	14
1.5 TOXOPLASMOSE EM OVINOS	18
1.5.1 Epidemiologia	18
1.5.2 Diagnóstico	21
1.5.3 Prevalência e Fatores de Risco	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE LAGES	28
2.2 COLETA DE DADOS	28
2.2.1 Coleta de amostras de sangue	28
2.2.2 Aplicação de questionário	29
2.2.3 Obtenção do soro	29
2.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - RIFI	29
2.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO - ELISA	30
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
2.6 COMITÊ DE ÉTICA	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	55

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, geralmente de caráter assintomático, causada pelo coccídio *Toxoplasma gondii*. O parasito é classificado na ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, sendo os hospedeiros definitivos membros da família Felidae e os hospedeiros intermediários, todos os animais homeotérmicos como aves e mamíferos.

A ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais é a principal forma de infecção para animais carnívoros e onívoros, enquanto a ingestão de oocistos é a principal para herbívoros. A transmissão transplacentária por taquizoítos, tem sido responsabilizada pela ocorrência de abortos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal para humanos e animais, sendo essa uma das principais causas de perdas em rebanhos, sobretudo para suínos e pequenos ruminantes. Em todos os casos, os agravos mais severos da infecção ocorrem no primeiro trimestre da gestação. A enfermidade é grave, também, em indivíduos imunossuprimidos.

A principal repercussão clínica e econômica da toxoplasmose ovina é o aborto, ocasionando perdas por natimortalidade e nascimento de animais fracos. Portanto, a determinação da soroprevalência desta parasitose em ovinos, é de grande auxílio para o conhecimento da epidemiologia desta zoonose.

O rebanho ovino das mesorregiões Oeste e Serrana são responsáveis por mais de 60% do efetivo catarinense. Dentro deste percentual, também apresenta destaque a população ovina do município de Lages.

O sistema de criação dos rebanhos em Lages é predominantemente semiextensivo, não havendo um controle reprodutivo individual nas propriedades. Desta forma, não se conhece, de forma real, as taxas de perdas gestacionais e de cordeiros nos rebanhos. Além disso, pouco se conhece acerca das causas das desordens reprodutivas e do envolvimento nessas, do *T. gondii*.

Considerando-se a extrema relevância da enfermidade e a carência de dados sanitários referentes à ovinocultura no Estado, realizou-se o presente estudo, com os objetivos de estimar a prevalência de ovinos infectados por *T. gondii* no município de Lages, Santa Catarina, Brasil, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e do ensaio

imunoenzimático indireto (ELISA) e de identificar possíveis fatores de risco para a infecção por *T. gondii* na região.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A toxoplasmose ovina é uma doença parasitária de elevada importância em medicina veterinária e em saúde pública, uma vez que acarreta prejuízos aos animais de produção (O'ROURKE, 2002), e que também servem como fonte de infecção para o ser humano (GARCIA et al., 1999; WALSH et al., 1999).

Desordens reprodutivas como abortos e neonatos mortos ou fracos, que evoluem para óbito, geram perdas econômicas consideráveis em rebanhos ovinos (PEREIRA-BUENO et al., 2004; LOPES, 2007).

São raros os trabalhos que mensuram as perdas provocadas pela toxoplasmose em ovinos. No Uruguai, estima-se que de 1,4 a 3,9% das gestações sejam perdidas devido à enfermidade, o que significaria US\$ 1,4 milhão a 4,68 milhões por ano ou US\$ 10 a 12 por cordeiro (FREYRE et al., 1999).

Revisando estudos realizados em vários países que determinaram as causas de mortalidade perinatal e abortamentos em rebanhos ovinos, Blewett e Watson (1984) encontraram prevalências de *T. gondii* variando entre 0,6 e 27% nas propriedades pesquisadas na Inglaterra. No Centro Norte dos Estados Unidos, a toxoplasmose foi a principal doença associada a abortamentos e morte perinatal em ovinos, com 17,5% dos casos, seguida por campilobacteriose com 9,9% e clamidiose com 4,7% (DUBEY; KIRKBRIDE, 1990). Já no Oregon, EUA, a toxoplasmose foi diagnosticada como a terceira causa infecciosa/parasitária de abortamento e mortalidade perinatal em ovinos, com 12,6% dos diagnósticos, atrás de campilobacteriose com 15,2% e clamidiose com 12,8% (DUBEY et al., 1990).

Hartley et al. (1954) na Nova Zelândia, reconheceram o *T. gondii* como agente etiológico de abortos na espécie ovina. Desde então, é considerado a principal causa de problemas reprodutivos nesta espécie (SILVA et al., 2003).

1.2 O PARASITO

No início do século XX, Nicolle e Manceaux (1908) relataram a presença de um parasito intracelular no baço e no fígado de um roedor (*Ctenodactylus gondi*), no Norte da África. Eles acreditaram tratar-se de uma forma particular de *Leishmania*, denominando-o *Leishmania gondi*. No Brasil, Splendore (1908) observou o mesmo parasito no coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e também o comparou ao agente da leishmaniose visceral. Em 1909, no entanto, os primeiros autores constataram que se tratava de um novo parasito, sendo então criado o gênero *Toxoplasma* (nome derivado da junção dos termos *toxon*, vocábulo grego para aludir ao formato de arco do parasito e *plasma*, vocábulo que significa forma) e a espécie *T. gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). Nos anos 60, formas do parasito foram encontradas em fezes de gatos (HUTCHISON, 1965) e o ciclo biológico foi determinado por Frenkel, Dubey e Miller (1970) quando identificaram os estágios sexuais do *T. gondii* no intestino delgado de gatos, e os oocistos nas fezes, confirmando o gato como hospedeiro definitivo.

Este protozoário é um coccídio intracelular obrigatório, de distribuição mundial, podendo ser encontrado em grande variedade de hospedeiros vertebrados (DUBEY; BEATTIE, 1988; CARRUTHERS, 2002). O *T. gondii* é classificado no Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae e Subfamília Toxoplasmatinae (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

As duas principais formas envolvidas na transmissão do parasito são o cisto tecidual, que pode alcançar, segundo Dubey (1977) 100µm de diâmetro e conter centenas de bradizoítos, e o oocisto, onde são encontrados os esporozoítos. O taquizoíto é a forma encontrada durante a fase aguda da infecção e possui importante função na transmissão vertical. Essa forma multiplica-se por endodiogenia, processo de brotamento interno, onde duas células filhas são formadas dentro da célula mãe e liberadas após a ruptura. O taquizoíto é encontrado dentro do vacúolo citoplasmático (vacúolo parasitóforo) de várias células, como nas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), nos líquidos orgânicos, excreções, nas células hepáticas, pulmonares, nervosas, submucosas e musculares. Apresenta-se sob a forma de meia lua, medindo de 2µm x 6µm, com uma extremidade arredondada e outra ligeiramente afilada (DUBEY, 1977). O núcleo é esférico, oval ou alongado, de aspecto vesiculoso, e situa-se no meio do corpo ou mais próximo da extremidade posterior, tendo a cromatina disposta em rede ou como grânulos aderidos à face interna da membrana (REY, 2001).

O bradizoíto é a forma encontrada geralmente durante a fase crônica da infecção,

podendo ser encontrado em vários tecidos do hospedeiro (nervoso, muscular e retina). Parecidos morfológicamente com os taquizoítos, os bradizoítos apresentam tamanho variável, dependendo da célula parasitada e do número de bradizoítos em seu interior (DUBEY, 1977).

Os oocistos são esféricos medindo $12,5\mu\text{m} \times 11\mu\text{m}$ e são eliminados imaturos junto com as fezes dos felídeos (JACKSON; HUTCHISON, 1989; NEVES, 2004). O oocisto esporulado contém dois esporocistos elipsóides, com quatro esporozoítos em cada um, que são as formas infectantes, medindo $2\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$ (DUBEY, 1998; ARAMINI et al., 1999).

1.3 CICLO BIOLÓGICO

O *T. gondii* é capaz de infectar e se replicar dentro de qualquer célula nucleada mamífera ou aviária (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

O ciclo do *T. gondii* é heteroxeno facultativo, sendo hospedeiros definitivos os membros da família Felidae, domésticos e selvagens, onde ocorre o ciclo sexuado e a eliminação de oocistos nas suas fezes. Várias espécies de mamíferos e aves comportam-se como hospedeiros intermediários, inclusive os próprios felídeos, já que nestes a reprodução assexuada em tecidos extraintestinais também pode ocorrer (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O ciclo sexuado ocorre no intestino de membros da família Felidae onde, após uma série de esquizogonias, acontece a diferenciação dos gametas, a fecundação e a formação de oocistos. Os felídeos eliminam em suas fezes oocistos não esporulados que, em condições ambientais propícias de temperatura, umidade e oxigenação, tornam-se infectantes. A esporulação dos oocistos ocorre no ambiente, entre um a cinco dias após a liberação nas fezes (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Em estudos laboratoriais foi evidenciado que os oocistos são muito resistentes às variações ambientais, podendo suportar temperaturas de -21°C por no mínimo 28 dias (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970), 30°C por 107 dias, 40°C por 24 horas (FRENKEL; DUBEY, 1972) e 50°C por uma hora (DUBEY, 1998). Em condições naturais, Frenkel e Dubey (1975) obtiveram oocistos viáveis em fezes que foram expostas a temperaturas que variaram entre -20°C e 35°C por um período de 548 dias no Kansas, EUA. Os oocistos também são muito resistentes aos desinfetantes, normalmente usados, permanecendo viáveis mesmo após a exposição à formalina (10%) por 48 horas, ácido sulfúrico (63%) e dicromato (7%) por 30 minutos (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970), etanol (95%) e ácido acético

(5%) por uma hora (FRENKEL; DUBEY, 1972), lauril sulfato de sódio (0,1%) por 24 horas e amônia líquida (5,5%) por uma hora (ITO et al., 1975).

A ingestão de oocistos pode ocorrer através de água e alimentos contaminados pelas fezes dos hospedeiros definitivos (DUBEY, 1998; ARAMINI et al., 1999). Outra forma de infecção do *T. gondii*, pela via oral, ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais. Após a ingestão dos cistos ou oocistos, a parede externa é rompida por degradação enzimática e as formas infectantes, bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, são liberadas no lume intestinal, onde rapidamente invadem as células do hospedeiro e se diferenciam em taquizoítos, por divisão assexuada (DUBEY, 1998; GROSS; HOLPERT; GOEBEL, 2004).

O período inicial da infecção caracteriza a fase aguda da doença, onde os taquizoítos se multiplicam rapidamente por repetidas endodiogenias em diferentes tipos de células, rompendo estas, causando infecção sistêmica. Embora o parasito seja intracelular, pode sobreviver por breves períodos nos líquidos intersticiais e exsudatos (CHIARI, 1981). Foram constatados taquizoítos na saliva e na urina (VITOR; PINTO; CHIARI, 1991), no sêmen de bovinos (SCARPELLI et al., 2009), de ovinos (TEALE et al., 1982; AGANGA et al., 1988; LOPES, 2007) e de suínos (MOURA et al., 2007), no leite de cabra (CHIARI; NEVES, 1984) e de ovelha (CAMOSSO, 2010). Com o desenvolvimento da imunidade, a multiplicação dos taquizoítos é interrompida e ocorre a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos, formas de multiplicação lenta, o que caracteriza a fase crônica da infecção (FILISSETTI; CANDOLFI 2004; GROSS; HOLPERT; GOEBEL, 2004). Nos humanos, estes cistos teciduais se localizam predominantemente no sistema nervoso central, na retina e nas musculaturas esquelética e cardíaca (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; DUBEY et al., 2004).

1.4 TOXOPLASMOSE EM HUMANOS

Em humanos, a infecção é muito comum, porém a enfermidade clínica é pouco frequente. Aproximadamente um terço da humanidade foi exposta ao parasito (HILL; DUBEY, 2002). As prevalências variam de 0 a 100%, conforme a região e o grupo étnico estudado (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Na população humana, a infecção por *T. gondii* está relacionada com o consumo de carne mal cozida que contenha cistos viáveis deste parasito, com a ingestão de alimentos ou

água contaminados com oocistos provenientes de fezes de felídeos e infecção congênita (HILL; DUBEY, 2002); provavelmente, por infecção transmamária (BONAMETTI et al., 1997); transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais e ingestão de leite cru (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; HILL; DUBEY, 2002). Taquizoítos de *T. gondii* foram encontrados em leite de muitos hospedeiros intermediários como ovelhas, cabras e vacas (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2001), porém a toxoplasmose aguda em humanos, somente foi associada ao consumo de leite de cabra não pasteurizado (CHIARI; NEVES, 1984). Desta forma, as fontes de infecção variam em diferentes populações com diferentes culturas e hábitos alimentares (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Somente nos EUA é provável que ocorram 1.437.500 novos casos de infecção por *T. gondii*, com um custo aproximado de US\$ 445 milhões por ano (TODD, 1989). No mesmo País, segundo Saad et al. (1996), aproximadamente 300 pessoas morrem anualmente devido à toxoplasmose, tanto na sua forma neonatal, com estimativas de que uma em cada mil crianças nascidas por ano tenha toxoplasmose congênita (JONES et al., 2001), quanto em indivíduos com severa imunossupressão iatrogênica (transplantados, tratamento de neoplasias, pacientes submetidos à diálise renal) ou que sofram de enfermidades imunossupressoras como doenças autoimunes ou a síndrome de imunodeficiência adquirida – AIDS (LOPES, 2007).

Em pacientes com AIDS, a toxoplasmose manifesta-se com uma elevada frequência, sendo considerada uma doença oportunista (LUFT; REMINGTON, 1988; PASSOS; ARAÚJO FILHO; ANDRADE JUNIOR, 2000), que provoca a reativação dos cistos, principalmente os cerebrais, produzindo grave encefalite (PRADHAN; YADAV; MISHRA, 2007). Potasman et al. (1987) observaram uma frequência de encefalite por *T. gondii* entre 6 e 10% de pacientes aidsícticos nos EUA. Estima-se que de 10 a 30% dos pacientes com AIDS morram por toxoplasmose (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Rey e Ramalho (1999) em estudos de prevalência de *T. gondii* em indivíduos da cidade de Fortaleza, estado do Ceará, constataram um rápido aumento na positividade, nos primeiros dez anos de vida, sugerindo que a maioria das infecções primárias, sejam adquiridas durante a infância. Fato este que pode estar associado ao contato domiciliar com gatos e famílias numerosas, que provavelmente deixam a desejar na higiene e cuidado com as crianças. Em certas regiões do País, aproximadamente 60% das crianças de seis a oito anos de idade têm anticorpos contra *T. gondii*, em consequência da ingestão de oocistos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Tenter, Heckeroth e Weiss (2000) constataram que em 10% das crianças infectadas congenitamente, a toxoplasmose pode levar à clássica tétrade de sinais (retinocoroidite, hidrocefalia, calcificação intracerebral e distúrbios psicomotores) e

estimaram que um terço das crianças infectadas congenitamente desenvolvem problemas oculares em alguma época da vida. Na toxoplasmose, as alterações oculares estão entre as mais frequentemente observadas (GARCIA et al., 2005).

A infecção fetal pode determinar graves sequelas (STRAY-PEDERSEN, 1993), entretanto, os efeitos sobre o feto e a gravidade da doença dependerão da virulência da cepa do parasito, da quantidade de formas infectantes, da competência imunológica da mãe e do período gestacional em que a mulher se infectou (DESMONTS; COUVREUR, 1974).

Em mulheres grávidas o risco de infecção congênita é menor no primeiro trimestre da gestação (10-15%) e maior quando a infecção ocorre durante o terceiro trimestre (60-90%) (DUBEY; JONES, 2008). Ravel (1998) relatou que quando a infecção aguda foi adquirida no primeiro trimestre de gravidez, 14% dos fetos estavam infectados, no segundo trimestre 29% e no terceiro, 59%. Observou, ainda, que 90% das gestantes que apresentaram infecção aguda eram assintomáticas. Desmonts e Couvreur (1974) verificaram que, embora menos frequente, a infecção fetal era mais grave quando a mãe era infectada durante o primeiro trimestre da gravidez. Em compensação, quando a infecção materna acontecia no último trimestre, a doença fetal ocorria com maior frequência e com manifestações clínicas discretas. Portanto, no decorrer da gestação, aumenta o risco de transmissão vertical e diminui a gravidade do acometimento fetal (FERREIRA ISABEL, 2006).

Em pacientes, sem comprometimento imunológico, a toxoplasmose vem sendo associada à linfadenopatia, febre, fraqueza, debilidade, oftalmite, infecções multissistêmicas e, recentemente, à esquizofrenia e outras desordens psiquiátricas (McALLISTER et al., 2005).

Os surtos estão geralmente relacionados a pequenos grupos de indivíduos ou a famílias. Relatos de surtos são escassos, não em virtude da sua inexistência, mas devido ao fato dos sintomas serem, na maioria das vezes, ausentes ou brandos, o que acarreta dificuldades para a identificação clínica desta enfermidade e sua posterior confirmação laboratorial e notificação. Além disso, a sintomatologia da toxoplasmose pode ser confundida com outras enfermidades. Desta forma, a grande maioria dos relatos está relacionada a cepas com grande virulência, que causam alterações clínicas agudas e características da infecção toxoplásmica, e à existência de uma vigilância constante em relação a esta doença (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Um surto de toxoplasmose, envolvendo cinco membros de uma família libanesa, é tido como o primeiro reportado na Austrália. A via de infecção neste caso foi o quibe, um prato tradicional libanês, no qual a carne crua ovina é componente essencial e que não sofre nenhum tipo de processamento térmico para o consumo. Este surto foi descoberto

eventualmente devido a um surto de hepatite A, ocorrido em pessoas dessa mesma família (DE SILVA; MULCAHY; KAMATH, 1984).

Na Austrália, durante um coquetel em Queensland, um surto de toxoplasmose aguda e congênita foi associado ao consumo de carne de canguru e de cordeiro, que não haviam recebido tratamento térmico adequado (ROBSON et al., 1995).

No Canadá, um surto de toxoplasmose congênita em pessoas de um povoado de Inuits, ao norte de Quebec, foi associado ao consumo frequente de carne de caribu (*Rungifer caribou*). A soropositividade, em mulheres grávidas do mesmo povoado, foi relacionada ao consumo de carne de foca seca, fígado de foca e carne de caribu crua (McDONALD et al., 1990).

No Brasil, o primeiro relato de surto de toxoplasmose, na literatura médica, foi feito por Magaldi et al. (1967). Apresentaram toxoplasmose 30 de um total de 81 pessoas que viviam em um seminário em Bragança Paulista, estado de São Paulo. Em virtude do pouco conhecimento sobre a epidemiologia da doença, naquela época, os autores chegaram ao fim da investigação sem comprovações e conclusões a respeito das fontes de infecção ou das vias de transmissão.

Bonametti et al. (1997) relataram a ocorrência de um surto em uma festa árabe realizada na cidade de Bandeirantes, estado do Paraná. Nesta festa 17 pessoas se contaminaram pela ingestão de quibe cru de carne de carneiro. Estas apresentaram quadro clínico e perfil sorológico sugestivo de toxoplasmose aguda. A faixa etária variava entre seis e 57 anos de idade. Embora não se tenha comprovado a transmissão por meio da amamentação, em mulheres, os mesmos autores descreveram um caso positivo de toxoplasmose em uma criança, cuja dieta era constituída exclusivamente de leite materno. A mãe fazia parte do grupo de 17 indivíduos, participantes da festa. Um inquérito sorológico na propriedade de origem dos ovinos revelou 43% dos animais positivos para a protozoonose.

Outro surto importante ocorreu no município de Santa Isabel do Ivaí, Noroeste do Paraná, numa população de 9000 habitantes, cerca de 600 pessoas procuraram o serviço de saúde, entre novembro de 2001 e janeiro de 2002, com sintomas característicos de toxoplasmose. Destas, 426 apresentaram sorologia compatível com toxoplasmose aguda (IgM). Sete casos ocorreram em gestantes, sendo que uma apresentou aborto espontâneo e seis tiveram filhos infectados e um deles, com anomalia congênita grave, veio a óbito. Num primeiro exame oftalmológico de 176 casos avaliados, 14 (8%) apresentaram alterações sugestivas de toxoplasmose ocular. O surto ocorreu em virtude da contaminação de um reservatório de água da cidade por oocistos eliminados em fezes de gatos jovens que

habitavam o local. A água era captada em poço artesiano e não passava por processos de coagulação ou filtração, sendo apenas clorada. Além dos indícios epidemiológicos, oocistos de *T. gondii* foram recuperados em uma caixa d'água de uma escola pública do município (SILVEIRA, 2002).

Uma das formas de reduzir a infecção humana por *T. gondii* é destruir os cistos da carne, submetendo-a a um tratamento térmico de 67°C por 20 minutos, com garantia de que o calor penetre igualmente no alimento. O congelamento a -13°C por 18 a 24 horas, pode ser considerado uma forma de destruição dos cistos (HILL; DUBEY, 2002).

Navarro et al. (1992) verificaram a resistência dos cistos de *T. gondii* ao efeito do sal e de condimentos em linguiças do tipo frescal, elaboradas com carne de suínos experimentalmente infectados. Concluíram que somente após 48 horas a ação do sal em concentrações de 2,0 e 2,5 %, inviabilizou o *T. gondii*.

A profilaxia e o controle da enfermidade passam por medidas como lavar bem as mãos e os utensílios após manipulação de carne crua para não ingerir formas infectantes, assim como higienizá-las após contato com fezes de gato e após mexer na terra que pode estar contaminada com oocistos. Deve ser evitado o consumo de carne crua ou mal cozida e de leite de cabra não pasteurizado. É necessário cobrir o tanque de areia das crianças, quando não estiver em uso, evitando a contaminação com fezes de animais. A caixa de areia dos felinos deve ser limpa, diariamente, a fim de evitar contato com oocistos esporulados. O destino adequado dessas fezes é a incineração. Deve-se alimentar os gatos exclusivamente com ração comercial e combater ratos e camundongos, além de fazer o controle da população felina (HILL; DUBEY, 2002).

Mulheres grávidas soronegativas para o *T. gondii* devem evitar contato direto com as fezes de gatos, solo ou ingerir carne mal passada. Devem beber água tratada e fazer a sorologia antes da gravidez e pelo menos trimestralmente, durante a gestação (LOPES, 2007). Pacientes imunodeprimidos com sorologia negativa também devem fazer exames periódicos, para permitir o diagnóstico da infecção logo no início (PIZZI, 1997).

1.5 TOXOPLASMOSE EM OVINOS

1.5.1 Epidemiologia

Dentre os animais de produção, o ovino é um dos que mais comumente apresenta-se

infectado, juntamente com os suínos, caprinos e coelhos (DUBEY; THULLIEZ, 1993).

A alta prevalência da toxoplasmose em ovinos pode decorrer da menor resistência desta espécie ao parasito e às próprias condições de exploração, que expõem estes animais à maior probabilidade de contato com os oocistos eliminados pelos gatos (LOPES, 2007).

O primeiro relato de toxoplasmose ovina foi realizado por Olafson e Monlux (1942), nos Estados Unidos. Estes pesquisadores, além de descreverem as lesões e os sinais clínicos da doença, encontraram também as formas típicas do parasito em uma ovelha adulta, que havia apresentado sintomas nervosos, aumento de temperatura e rigidez muscular 14 dias antes de morrer. O diagnóstico para esta zoonose foi estabelecido após necropsia e exame histopatológico do cérebro e medula espinhal do animal. Mesmo com esse relato, somente a partir de 1954, o *T. gondii* foi reconhecido como agente etiológico de abortos nas ovelhas e considerado a principal causa de problemas reprodutivos nesta espécie (SILVA et al., 2003).

A infecção pelo protozoário em ovinos geralmente é inaparente e, em animais adultos, costuma se restringir à esfera reprodutiva, não provocando mortalidade (DUBEY et al., 1990). Além dos problemas reprodutivos, outro sinal clínico configura-se na hipertermia, logo após a infecção (BUXTON; FINLAYSON, 1986). Eventualmente, pode haver uma forma neurológica da toxoplasmose, com paralisia progressiva dos membros, febre e leucocitose (McEARLEAN, 1974). Em condições experimentais, ovinos também podem apresentar letargia, diarreia e/ou sintomas respiratórios (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994). Em Jaboticabal, estado de São Paulo, oito ovinos foram inoculados com *T. gondii* e apresentaram sinais clínicos de hipertermia, distúrbios respiratórios (dispneia, tosse e corrimento nasal), anorexia, diarréia, tremores musculares e prostração (MARQUES; COSTA, 1982).

Os abortamentos podem ocorrer de forma esporádica ou epidêmica dentro de uma propriedade, dependendo do nível de exposição do rebanho e da presença ou não de animais imunes (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994).

Os problemas reprodutivos geralmente acontecem, quando a ovelha infecta-se pela primeira vez durante a prenhez. Ovelhas infectadas antes da prenhez não apresentam falhas reprodutivas (BEVERLEY; WATSON, 1971). Blewett, Miller e Buxton (1982) confirmaram que uma única infecção pode conferir imunidade duradoura e ovelhas não infectadas, quando inoculadas durante a prenhez, apresentaram 22% de perdas fetais, enquanto ovelhas previamente infectadas dois anos antes, não abortaram, mantiveram títulos altos na hemaglutinação indireta (HAI) durante esses dois anos e pariram filhotes saudáveis e não infectados. A explicação provável é que a infecção crônica previne novas parasitemias e impede que o agente alcance o feto (BUXTON; FINLAYSON, 1986). Essa imunidade

também faz com que as ovelhas raramente abortem por toxoplasmose repetidamente, mesmo que sejam reinfectadas durante uma nova gestação, e a maioria delas gera crias livres de infecção (BEVERLEY; WATSON, 1971; BUXTON; FINLAYSON, 1986).

O efeito da infecção transplacentária depende do estágio da gestação em que ocorre a infecção. Se esta ocorrer antes dos 50 dias de gestação, o resultado é a morte embrionária precoce e reabsorção. Se ocorrer entre 50 e 90 dias pode levar à morte fetal seguida de abortamento ou mumificação, natimortalidade ou morte neonatal. Se ocorrer no último mês da gestação, o cordeiro pode nascer vivo com infecção inaparente ou nascer livre de infecção (BLEWETT; WATSON, 1983). Inoculação experimental em ovelhas na metade da gestação provocou 50% de morte fetal, enquanto todas as ovelhas inoculadas no último mês de gestação deram à luz a filhotes vivos (BEVERLEY; WATSON, 1971).

O protozoário percorre a circulação sanguínea, chega ao septo caruncular onde se multiplica, provocando necrose focal e finalmente invade o trofoblasto e se dissemina no feto. Após 20 a 30 dias ocorre uma resposta celular fetal. O sistema imune do feto não precisa estar totalmente maduro para responder ao *T. gondii*, o que explicaria em parte a sobrevivência do feto, quando a infecção ocorre no final da gestação (BUXTON; FINLAYSON, 1986).

Em algumas propriedades os abortos ocorrem apenas em ovelhas recentemente introduzidas. Isso pode acontecer se a toxoplasmose for endêmica na propriedade e ovelhas não imunes introduzidas forem colocadas imediatamente em reprodução, não havendo tempo para se infectarem antes da prenhez. Assim, alguns autores sugerem que essas ovelhas sejam introduzidas algum tempo antes da reprodução para que se infectem e adquiram imunidade (BEVERLEY; WATSON, 1971).

Em machos adultos, o único sinal clínico observado em infecção experimental foi febre, não havendo alteração na qualidade do sêmen. Apesar dos carneiros eliminarem *T. gondii* no sêmen, a transmissão venérea provavelmente não é importante, porque a eliminação ocorre em um curto período de tempo (TEALE et al., 1982). Aganga et al. (1988), na Nigéria, num trabalho envolvendo inoculação de reprodutores ovinos (cepa TS-1), recuperaram *T. gondii* em amostras seminais colhidas no 21º dia pós inoculação (DPI) de todos os machos infectados. Lopes (2007), em Jaboticabal, estado de São Paulo, observaram hipertermia em ovinos machos experimentalmente infectados, inoculados com taquizoítos nos 3º, 5º e 7º DPI e três animais inoculados com oocistos de *T. gondii* (cepa P), apresentaram fezes pastosas, inapetência e apatia nos 5º e 7º DPI, coincidindo com o quadro de aumento da temperatura corporal. Das amostras seminais positivas na sorologia (RIFI) e bioprova nos camundongos inoculados com sêmen, também foi possível detectar a presença de *T. gondii* pela técnica de

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos 11°, 14°, 21°, 56° e 70° DPI por taquizoítos e nos 14°, 35°, 42°, 56° e 63° DPI por oocistos. Também foi detectada a presença do *T. gondii* nas amostras seminais (bioprova e PCR) dos ovinos experimentalmente inoculados, sugerindo possibilidade de transmissão venérea.

O controle e a prevenção passam por medidas que visam evitar ou minimizar a contaminação da água e alimentos por oocistos, como o controle da população de gatos na propriedade, manutenção desses animais fora da área de criação dos ovinos e o correto armazenamento de grãos e feno. Outras medidas incluem a remoção imediata, seguida de incineração ou enterro, de abortos e membranas fetais e a exposição de animais introduzidos na propriedade ao ambiente contaminado, antes da cobertura (DUBEY, 1994; BUXTON, 1998).

Pesquisas com vacinas para animais estão sendo realizadas com o intuito de prevenir, em felídeos, a eliminação de oocistos e a conseqüente contaminação ambiental (GARCIA, 2009). Nos animais de produção, para diminuir o número de cistos teciduais e impedir a infecção transplacentária, minimizando as perdas econômicas na indústria animal (DUBEY, 1996; FREIRE et al., 2003). Uma vacina para ovinos está comercialmente disponível na Nova Zelândia e Europa. Feita a partir de taquizoítos atenuados da amostra S48, ela diminui as perdas fetais de ovelhas em reprodução, porém não impede a infecção do feto, sendo uma vantagem o fato de o parasito não persistir no tecido da ovelha vacinada (DUBEY, 1996; BUXTON, 1998).

1.5.2 Diagnóstico

A utilização de testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra *T. gondii* é de grande importância no diagnóstico da toxoplasmose ovina, frente às limitações encontradas nos diagnósticos parasitológico, molecular e clínico (CHIARI; LIMA; LIMA, 1986; BAHIA, 1993; COSTA et al., 2007). Além disso, quando sintomática, a toxoplasmose pode assumir quadros clínicos facilmente confundidos com grande variedade de enfermidades, dificultando a tomada de medidas específicas de controle e tratamento (VIDOTTO, 1992).

Vários autores realizaram o diagnóstico sorológico da toxoplasmose animal pela presença de anticorpos, principalmente da classe IgG, utilizando uma variedade de reações sorológicas, entre as quais a de Sabin-Feldman ou teste do corante (GARCIA-VAZQUEZ et al., 1993), a hemaglutinação indireta (HAI) (HASHEMI-FESHARKI, 1996; LANGONI et al.,

1999; GORMAN et al., 1999), a imunofluorescência indireta (RIFI) (MAINARD et al., 2003; FIGLIUOLO et al., 2004; UZÊDA et al., 2004), a aglutinação do látex (LAT) (HASHEMI-FESHARKI, 1996; PITA-GONDIM et al., 1999; JITTAPALAPONG et al., 2005), o método da aglutinação direta (MAD) (SILVA; CUTOLO; LANGONI, 2002), o teste da aglutinação modificado (MAT) (KLUN et al., 2005), a reação imunoenzimática – ELISA (SKJERVE et al., 1998; CAVALCANTE, 2004; SAWADOGO et al., 2005) e dot-ELISA (BAHIA, 1993).

Um marcador sorológico capaz de distinguir entre infecções agudas e crônicas, é a avidéz dos anticorpos IgG específicos (BAHIA et al., 1995; CONDE et al., 2001). Em infecções recentes, uma alta porcentagem destes anticorpos apresenta baixa avidéz, e ao longo de semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que, nas infecções de mais longa duração, encontra-se um predomínio marcante de anticorpos de grande afinidade. Bahia et al. (1995) avaliaram a avidéz de anticorpos IgG como marcador sorológico de infecção recente e crônica de caprinos pelo *T. gondii* através da dissociação do complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac), com ureia. Sager et al. (2003) e Gross, Holpert e Goebel (2004) também associam a presença de anticorpos anti IgG de alta avidéz a infecções tardias.

Soro e líquidos cavitários fetais podem ser utilizados para o diagnóstico de aborto por *T. gondii*, pois os anticorpos da mãe não atravessam a placenta. A ausência de anticorpos, entretanto, não exclui o diagnóstico de toxoplasmose, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos depende da idade do feto e do tempo decorrente entre a infecção e o exame (DUBEY et al., 1990). A soropositividade da mãe, por sua vez, não confirma o diagnóstico, porque a prevalência entre ovinos é alta e títulos elevados podem permanecer até a próxima gestação (DUBEY; KIRKBRIDE, 1984). Se anticorpos maternos não forem detectados, há pequena chance do protozoário ter provocado o abortamento, pois o título costuma aumentar antes do abortamento (DUBEY et al., 1990).

Macroscopicamente, a placenta infectada apresenta pequenos nódulos esbranquiçados nos cotilédones que podem chegar a dois milímetros de diâmetro e, que correspondem, na microscopia, a áreas de inflamação focal que progridem para necrose com material caseoso e calcificação (DUBEY et al., 1990). As lesões placentárias são muito mais comuns e severas que as lesões fetais (BEVERLEY; WATSON; PAYNE, 1971).

Os fetos não apresentam lesões macroscópicas patognomônicas de toxoplasmose (HARTLEY et al., 1954; BEVERLEY; WATSON; PAYNE, 1971). O órgão mais frequentemente atingido no feto é o cérebro, que apresenta encefalite não supurativa com necrose e infiltração de células mononucleares ao exame histopatológico. Outros órgãos,

como pulmões, fígado, coração e rins também podem apresentar inflamação e necrose. Pontos brancos podem ser vistos a olho nu nos pulmões e fígado (DUBEY et al., 1990).

O diagnóstico histopatológico da enfermidade depende mais da presença das lesões placentárias do que do encontro do parasito, que dificilmente é observado e muitas vezes pode estar em meio a áreas de necrose, dificultando sua identificação (BEVERLEY; WATSON; PAYNE, 1971).

Técnicas moleculares, além da sorologia, foram utilizadas para a realização do diagnóstico de toxoplasmose ovina. Masala et al. (2003), entre os anos de 1999 a 2002, analisaram 9639 amostras de soros pela RIFI e 815 amostras biológicas obtidas de fetos abortados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), procedentes de ovinos e caprinos da Sardenha, na Itália. Os autores mostraram, pela associação dos testes, que a prevalência de *T. gondii* em ovinos e caprinos é relativamente alta, além da importância da toxoplasmose nos casos de aborto nessas espécies.

Pereira-Bueno et al. (2004) analisaram a evolução de abortos em ovinos, associados à infecção por *T. gondii*, por meio de diferentes técnicas diagnósticas. Estes autores estudaram 173 fetos abortados, provenientes de diferentes localidades do centro e do norte da Espanha. Além da sorologia (ELISA e RIFI) utilizaram também a histopatologia (hematoxilina eosina) e ferramentas de biologia molecular (nested-PCR). A porcentagem de fetos positivos diagnosticados por técnicas sorológicas (28,3%) foi superior em comparação com os resultados de outras técnicas, sendo 8,7% detectados pelo exame histológico e 6,9% por meio da PCR.

A detecção de anticorpos através da sorologia é fundamental para o tratamento e controle da toxoplasmose, uma vez que a infecção, tanto em humanos como nos animais domésticos e silvestres, pode assumir quadros clínicos facilmente confundidos com várias infecções, além da grande maioria, ser assintomática (SILVA; CUTOLO; LANGONI, 2002).

Um método sorológico para ser utilizado em estudos soropidemiológicos precisa ser econômico, simples, sensível, específico, apresentar boa reprodutibilidade e concordância (CHIARI, 1981). Por essas razões, com relação à toxoplasmose animal, RIFI e ELISA são as técnicas mais utilizadas na rotina de diagnóstico e em levantamentos (ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1997). Chiari et al. (1985) verificaram que a sensibilidade da reação de Sabin-Feldman é menor do que a da RIFI, além desta técnica ter caído em desuso na rotina laboratorial devido, principalmente, à necessidade de manipulação de taquizoítos vivos.

Vários autores ressaltam a importância da RIFI como teste sorológico para a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii*. Chiari et al. (1987) e Serra-Freire, Norberg e Gazeta (1994)

descrevem a RIFI como uma reação sensível, específica e reprodutível afastando a possível ocorrência de reações falso positivas entre antígenos tissulares de *T. gondii* e de espécies do *Sarcocystis* ou outros coccídios. A RIFI é, portanto, uma técnica que merece destaque devido à sua alta sensibilidade, já demonstrada nas toxoplasmoses humana, de ovinos, suínos, bovinos entre outros animais. Como desvantagens destacam-se a subjetividade na leitura e a necessidade de equipamentos de alto custo (CAVALCANTE, 2004).

Em relação à RIFI são consideradas como amostras positivas, os soros ovinos que apresentam títulos iguais ou superiores a 1:64. Esta diluição aumenta a especificidade da reação, diminuindo assim, a presença de possíveis resultados falso positivos, sendo utilizada frequentemente por vários autores (VAN DER PUIJE et al., 2000; CAVALCANTE, 2004; FIGLIUOLO et al., 2004). Apesar de possíveis reações cruzadas, muitos autores utilizam a diluição 1:16 como ponto de corte para a RIFI (CHIARI et al., 1985; CHIARI et al., 1987; SERRA-FREIRE; NORBERG; GAZETA, 1994; MAINARD et al., 2003; SILVA et al., 2003; UZÊDA et al., 2004).

A maioria dos autores considera o ELISA mais sensível que a RIFI (GARCIA-VAZQUEZ et al., 1993; CONDE et al., 2001).

O ELISA torna-se uma boa opção para testes sorológicos por ser uma técnica prática, rápida, sensível e de leitura automatizada, ideal para levantamentos epidemiológicos (GARCIA-VAZQUEZ et al., 1993; SILVA; CUTOLO; LANGONI, 2002; SAWADOGO et al., 2005).

1.5.3 Prevalência e Fatores de Risco

O parasito tem distribuição mundial em animais e humanos. A infecção é teoricamente ausente apenas em ilhas e atóis que nunca foram habitados por gatos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; HILL; DUBEY, 2002; DUBEY; SU, 2009).

As prevalências da infecção por *T. gondii* em ovinos variam conforme a região e o teste sorológico utilizado. Blewett (1983) compilou 33 trabalhos em ovinos e encontrou um valor médio de 30%. Tenter, Heckeroth e Weiss (2000) revisaram levantamentos sorológicos em ovinos de vários países de 1990 a 2000 e observaram percentuais variando de 0 a 92%.

Estudos têm sido feitos na tentativa de associar certas características do animal, dos rebanhos ou do ambiente à infecção toxoplásmica.

Dubey et al. (1983) nos EUA, Gorman et al. (1999) no Chile e Van der Puije et al.

(2000) em Gana, observaram aumento da prevalência conforme o aumento da idade dos ovinos, contrariando os resultados de Huffman et al. (1981) e O'Donoghue, Riley e Clarke (1987), que não encontraram diferença significativa na sorologia dos animais com diferentes idades, nos EUA e Sul da Austrália, respectivamente.

Machos apresentaram maior soropositividade com relação às fêmeas em Pernambuco (SILVA et al., 2003), enquanto Van der Puije et al. (2000) observaram maior frequência entre fêmeas em Gana. Samad, Rahman e Halder (1993), em Bangladesh e Gorman et al. (1999), no Chile, não observaram diferenças entre os sexos.

Regiões mais úmidas parecem contribuir para uma maior prevalência da infecção. Gondim et al. (1999) verificaram maior soropositividade em ovinos da região do Recôncavo, região Litorânea (úmida), em relação à Caatinga (seca), assim como Silva et al. (2003) que encontraram maior soropositividade em caprinos da Zona da Mata (úmida) em relação ao Agreste (seca) de Pernambuco.

Na Austrália, houve diferenças na frequência de soros ovinos positivos entre diferentes regiões estudadas, mas os autores sugerem que o manejo intensivo aliado a uma maior lotação, característicos de algumas regiões, possam contribuir para o aumento da prevalência mais do que as diferenças climáticas entre as regiões (PLANT; FREEMAN; SAUNDERS, 1982).

Confinamento de ovinos e caprinos tem associação com a infecção (SILVA et al., 2003). Van der Puije et al. (2000), entretanto, verificaram que ovinos em Gana sob manejo extensivo, tinham prevalência significativamente maior.

Em Pernambuco, problemas reprodutivos não estavam associados à prevalência da infecção (SILVA et al., 2003), mas Plant, Freeman e Saunders (1982), na Austrália, observaram maior prevalência em propriedades de criação de ovinos com histórico de abortos em relação às demais. Em uma propriedade dos EUA, a mortalidade neonatal foi significativamente maior entre ovelhas soropositivas (30,7%), quando comparada com as ovelhas soronegativas (13,6%). Além disso, neonatos de ovelhas soropositivas tinham menor sobrevivência em relação aos filhotes das soronegativas, e ovelhas com título maior ou igual a 128 na HAI tiveram maior perda de cordeiros que aquelas com título menor ou igual a 64 (HUFFMAN et al., 1981). Savio e Nieto (1995), no Uruguai, observaram uma taxa de natalidade maior entre ovelhas que não soroconverteram durante a prenhez em relação às que soroconverteram.

Ueno (2005) pesquisaram a prevalência das infecções por *T. gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos em rebanhos comerciais do Distrito Federal.

Neste trabalho foram processados 1028 soros, dos quais 364 foram positivos para *T. gondii* à diluição 1:64 na RIFI, determinando uma frequência de 35,41%. As coletas foram realizadas em animais de 32 propriedades e a prevalência considerando as propriedades foi de 100%, e com relação aos animais prevalências variando de 4,76% a 96,55%. Os títulos de anticorpos variaram de 64 a 65536, sendo que os títulos com maior frequência foram 2048 (21,15%), 1024 (18,13%), 4096 (17,86%), 64 (10,44%) e 512 (10,16%).

Pita-Gondim et al. (1999) em estudos na Bahia utilizando a LAT, encontraram a soroprevalência de 18,75% em 240 ovelhas. Os autores consideraram positivas as amostras que apresentaram titulação maior ou igual a 1:64.

Estudo soroepidemiológico também foi realizado no estado de Pernambuco por Silva et al. (2003). De 173 amostras de soros provenientes de ovinos de duas regiões, foram encontrados 35,3% sororreagentes pela RIFI, considerando-se como ponto de corte a diluição 1:16. Neste trabalho foram encontradas associações significativas para raça e sexo, mas não para a região, tipo de manejo ou falha reprodutiva.

Amaral, Santos e Rebouças (1978) realizaram um estudo sobre a prevalência da toxoplasmose em ovinos procedentes do Rio Grande do Sul. Estes pesquisadores analisaram 100 soros pela HAI e relatam 23 positivos com títulos iguais ou superiores a 1:64. Destes 23 ovinos reagentes, 47,83% apresentaram títulos de anticorpos iguais a 1:64, 21,74% iguais a 1:256, 13,04% iguais a 1:1024 e 17,39% iguais a 1:4096. Também neste Estado, Larsson et al. (1980), encontraram a prevalência de 39%. Pappen (2008) realizaram estudo sobre a prevalência de anticorpos para *T. gondii* em ovinos da região sul do estado do Rio Grande do Sul. O total de soros testados pela RIFI foi de 1840, dos quais 450 foram positivos. Após o ajuste *a posteriori*, no qual foi definido um peso estatístico para cada uma das amostras, a prevalência calculada foi de 20,2%. A titulação máxima verificada foi de 1:4096 (8%), sendo que 70,8% dos ovinos positivos apresentaram titulações de anticorpos para *T. gondii* entre 1:256 e 1:1024.

Freire et al. (1995) e Garcia et al. (1999), na região Norte do Paraná, trabalhando com RIFI e utilizando a diluição 1:64 como ponto de corte, observaram soroconversão para *T. gondii* de 47,8% e 51,8% de sororreagentes respectivamente. No sul do mesmo Estado, Romanelli (2002) observaram prevalência de 51,4%, sendo que esta região apresenta uma ovinocultura bastante desenvolvida. Ogawa et al. (2003) realizaram um estudo sobre a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos da região de Londrina, Paraná e constataram 185 (54,6%) de sororreagentes a *T. gondii* pela RIFI. Moura et al. (2007) realizaram pesquisa sobre a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em suínos e ovinos

abatidos no município de Guarapuava, Paraná e verificaram que 11 ovinos (7%) foram sorologicamente positivos pela RIFI.

Langoni et al. (1999) estudando 352 amostras de soros ovinos de 18 propriedades do estado de São Paulo pela HAI e RIFI, relataram 30,4% de positividade pela HAI e 55,1% pela RIFI. Este levantamento reforça a importância da padronização das técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico desta infecção. No mesmo estado, Figliuolo et al. (2004) analisaram 597 ovinos encontrando uma taxa de positividade de 34,7% para a presença de anticorpos contra *T. gondii*. Esses autores utilizaram a RIFI na diluição 1:64 como critério de positividade e encontraram associação entre a idade dos animais e a presença de anticorpos contra *T. gondii*.

Carneiro (2006) no estado de Minas Gerais, realizaram um levantamento soropidemiológico da toxoplasmose caprina e ovina. Foram analisados 711 soros ovinos originados de diferentes mesorregiões do estado. Através do ELISA foi encontrada uma prevalência de 31,2%. Para a RIFI foram analisadas duas diluições do soro como critério de positividade e encontrados 43,2% para título 1:64 e de 68,8% para 1:16. Rossi e Cabral (2008), determinaram a frequência de anticorpos contra *T. gondii* em 155 amostras de soros ovinos de 2 propriedades rurais, no município de Uberlândia, Minas Gerais. Pela RIFI constatou-se 46,4% de animais soropositivos e através do ELISA, 63,2%.

Lopes et al. (2010) determinaram a prevalência e fatores de risco para *T. gondii* em ovinos na microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo. Das 488 ovelhas analisadas pela RIFI ($\geq 1:64$), 52% foram sororreagentes para *T. gondii*. Os fatores de risco foram: sexo, sistema de pastoreio, contato com gatos, utilização de suplementos minerais e tipo de nutrição dos animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE LAGES

O município de Lages possui uma área de 2.504,70 Km² (PML, 2007), com aproximadamente 161.583 habitantes (IBGE, 2000). Encontra-se situado no Planalto Serrano do estado de Santa Catarina, com altitude de 961 m, latitude de 27°48'S e longitude de 50°20'O, possuindo como cenário natural, superfície plana, ondulada e montanhas, com matas de Araucárias, campos limpos, sujos e campos de inundações. O clima é subtropical com temperatura média de 14,3°C, sendo a máxima de 35°C e a mínima de -7,4°C, com umidade relativa média de 79,3%, com meses de maior calor dezembro, janeiro, fevereiro e março (PML, 2007).

No município de Lages a população de ovinos foi estimada em 10.581 cabeças (CIDASC/ ICASA, 2008).

2.2 COLETA DE DADOS

2.2.1 Coleta de amostras de sangue

No período entre agosto de 2008 e julho de 2009, foram coletadas amostras de sangue de 360 ovinos, oriundos de 13 propriedades, definidas por conveniência, no município de Lages, estado de Santa Catarina, para obtenção de soro. De cada animal foram colhidos 5mL de sangue total, sem anti coagulante, por meio de punção da veia jugular externa com agulha 1,20mm x 40mm, após contenção do animal e desinfecção do local com álcool iodado. O sangue foi armazenado em tubos de ensaio estéreis, com capacidade de 12mL. Os tubos foram devidamente identificados, acondicionados em caixas de isopor sob refrigeração e transportados ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

2.2.2 Aplicação de questionário

Informações acerca de aspectos epidemiológicos, sanitários e de manejo, que poderiam ser potencialmente incriminados como fatores de risco para a infecção por *T. gondii*, foram obtidas por meio da aplicação de questionários aos proprietários, no dia da coleta de sangue. As variáveis analisadas foram: idade, sexo, raça, dieta, fonte de água, contato com gatos, problemas reprodutivos, sistema de criação e categoria animal.

2.2.3 Obtenção do soro

Para a obtenção do soro, as amostras foram submetidas ao banho maria em temperatura de 37°C durante 15 minutos, posteriormente foram centrifugadas a 385g por 10 minutos. O soro foi armazenado em microtubos tipo “Eppendorf”, identificados, separados em duas alíquotas (A e B) e refrigerados a -20°C até a realização das provas sorológicas (RIFI e ELISA).

2.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - RIFI

Para a realização da RIFI para toxoplasmose foram utilizados como antígeno taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. As lâminas, já preparadas com a suspensão de taquizoítos, foram gentilmente cedidas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os exames foram realizados de acordo com Camargo (1964).

Os soros foram diluídos em PBS (pH 7,2) em múltiplos de quatro (1:16 e 1:64) para triagem inicial. Em seguida, 12µL dos soros diluídos foram depositados nos respectivos poços de uma lâmina já adsorvida com antígeno de *T. gondii*, sendo a mesma logo após incubada em estufa a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se, então, a lavagem das lâminas com a mesma solução tampão já citada, durante 10 minutos, por três vezes. Após a secagem das lâminas em estufa a 37°C, por período que variava de 6 a 8 minutos, foram adicionados nos poços 10µL de uma solução contendo conjugado (anti IgG ovina¹ marcada com isotiocianato de fluoresceína), previamente padronizado na diluição 1:100 em PBS pH 7,2. As lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida,

¹ Sigma Chemical® F7634

submetidas a três lavagens e secas na estufa a 37°C por aproximadamente 6 a 8 minutos. Em seguida foi realizada a montagem com glicerina tamponada (pH 8,0) e lamínula.

A leitura das lâminas foi realizada no Centro de Diagnóstico de Microbiologia Animal (CEDIMA), no CAV/UEDESC, sendo considerados positivos os poços que apresentaram taquizoítos com fluorescência total e homogênea, enquanto os poços que apresentavam taquizoítos com fluorescência parcial ou apical foram considerados negativos (PARÉ; HIETALA; THURMOND, 1995). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram títulos na diluição $\geq 1:64$, considerado o ponto de corte para a espécie ovina (FIGLIUOLO et al., 2004). Os soros controles positivo e negativo, cedidos pela Universidade Estadual de Londrina, foram utilizados com a finalidade de comparação. As amostras positivas foram submetidas à titulação final em múltiplos de quatro (1:16 até 1:16384).

Aos proprietários foram encaminhados os resultados dos exames de Imunofluorescência Indireta por meio de laudos e repassadas as devidas informações quanto aos resultados.

2.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO - ELISA

Após a padronização da diluição dos soros, do conjugado e da concentração da proteína o teste de ELISA foi realizado como descrito por Garcia et al. (2006).

O antígeno, previamente titulado, foi diluído em tampão de adsorção carbonato bicarbonato, pH 9,6 (5µg/mL fração roptrias/mL) e, desta solução, 100µL foram transferidos para uma placa de poliestireno do tipo rígida, possuindo 96 cavidades com fundo plano. Para efetuar a adsorção, as placas foram refrigeradas em 6 a 8°C *overnight*. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem PBS Tween (PBS com 0,05% de Tween 20), através do lavador de microplacas programa JLG1, para a retirada dos antígenos não ligados à placa.

Os poços foram cobertos com 200µL de tampão de bloqueio (tampão de adsorção com leite em pó desnatado² a 8%), com função de bloquear os locais não imunes, ou seja, os locais em que o antígeno não se aderiu na parede do poço e incubados à temperatura de 37°C por uma hora em câmara úmida. A seguir, a lavagem foi repetida, três vezes com PBS Tween, pelo mesmo processo descrito anteriormente.

Os soros controle e testes foram diluídos em solução de leite em pó desnatado a 5%

² Molico®, Nestlé Brasil Ltda.

em PBS Tween a 1:50 e distribuídos na placa (100µL) nas cavidades em duplicata e incubados a 37°C por uma hora em câmara úmida. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS Tween.

O conjugado anti IgG ovino, marcado com peroxidase e diluído, conforme titulação prévia (1:5000), em solução de PBS Tween com leite em pó desnatado a 5% foi, então, distribuído nas cavidades da placa, na quantidade de 100µL, que novamente foi incubada a 37°C por uma hora em câmara úmida. Após três lavagens das placas, como já descrito, adicionou-se 100µL por poço de substrato cromógeno, preparado previamente, e depois de uma incubação de 20 a 25 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, realizou-se o bloqueio da reação com a adição de 50µL de ácido sulfúrico 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro operacional de 490nm e filtro diferencial de 600nm. Para o controle positivo e negativo os soros foram incluídos em cada placa e em um valor corrigido da DO (densidade óptica) calculado como a seguir:

$$DO_{\text{corrigida}} = [(DO_{\text{amostra}} - DO_{\text{controle negativo}}) / (DO_{\text{controle positivo}} - DO_{\text{controle negativo}})]$$

Um soro foi considerado como positivo quando a DO_{corr} foi maior que [DO média (controle negativo) mais 2 vezes o DP (desvio padrão do controle negativo)].

Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, concordância Kappa e eficácia a partir dos resultados do ELISA, tendo como referência a RIFI na diluição 1:64.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o cálculo da amostragem de animais utilizou-se o programa Epi Info (versão 6, CDC - Atlanta – Center for Disease Control and Prevention), presumindo-se prevalência para *T. gondii* de aproximadamente 30%, erro de 5% e IC (intervalo de confiança) de 95%.

A tabulação dos dados e o cálculo das prevalências foram feitos no programa Microsoft Excel® 2003.

As análises de associação foram realizadas pelos testes de Qui quadrado e Exato de Fischer ($p \leq 0,05$) para correlacionar os resultados da sorologia com os fatores de risco ou variáveis analisadas.

2.6 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UEDESC) no dia 30 de maio de 2008, protocolo nº 1.20.08.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais analisados são de 13 propriedades rurais localizadas no município de Lages, Santa Catarina. Em todas as propriedades foram diagnosticados animais positivos. Das 360 amostras de soro ovino submetidas à RIFI, para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii*, 205 (56,94%) foram positivas (Tabela 1). Entre os 56,94% de animais positivos, 28,29% foram reagentes na titulação de 1:64; 38,05% de 1:256; 22,44% de 1:1024; 9,76% de 1:4096 e 1,46% nos títulos iguais a 1: 16384. Quando submetidas ao ELISA 153 (42,50%) foram positivas (Tabela 2).

O alto percentual (100%) de propriedades com animais positivos está de acordo com os dados de Figliuolo et al. (2004) e Ueno (2005), obtidos em levantamentos semelhantes, no estado de São Paulo e no Distrito Federal, respectivamente. Essa alta prevalência evidencia que o *T. gondii* está amplamente distribuído nos rebanhos ovinos do município de Lages, Santa Catarina, independentemente do percentual de animais soropositivos em cada uma delas.

A alta porcentagem de ovinos sororreagentes ao *T. gondii*, (56,94% pela RIFI e 42,50% pelo ELISA), pode estar relacionada à contaminação do ambiente com o parasito. Embora a infecção vertical possa ocorrer, a presença de gatos e roedores, num mesmo ambiente de convívio, e a preferência dos ovinos ao consumo de pastagens de porte mais baixo, próximas à sede da propriedade rural, as quais os animais normalmente têm acesso, favorecem a ingestão de oocistos. Os gatos, presentes em diversos locais nas propriedades, principalmente com função de controlar roedores, têm fundamental importância na epidemiologia do *T. gondii*, já que os oocistos eliminados nas fezes dos mesmos podem, segundo Frenkel (1990), dependendo das condições ambientais, permanecer viáveis por vários meses, até anos, no meio ambiente.

Tabela 1 - Resultados obtidos por meio de RIFI (≥ 1 : 64), na pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos, no município de Lages, SC, no período de agosto de 2008 a julho de 2009, por variável analisada e total.

Variáveis	Categoria	Animais		Positivo ¹		Positivo ²	
		n	%	n	%	n	%
Idade	0-6 meses	62	17,22	33	53,23	33	16,09
	7-12 meses	64	17,78	29	45,31	29	14,15
	≥ 13 meses	234	65,00	143	61,11	143	69,76
Sexo	Machos	72	20,00	38	52,78	38	18,54
	Fêmeas	288	80,00	167	57,99	167	81,46
Raça	Raça Definida*	169	46,94	85	50,29	85	41,46
	Mestiços	191	53,06	120	62,83	120	58,54
Contato com Felinos	Sim	275	76,39	155	56,36	155	75,61
	Não	85	23,61	50	58,82	50	24,39
Dieta	Campo Nativo	110	30,56	70	63,64	70	34,15
	Mista	188	52,22	102	54,26	102	49,76
	Leite Materno e Campo Nativo	62	17,22	33	53,23	33	16,09
Fonte de Água	Bebedouros	46	12,78	27	58,69	27	13,17
	Açudes e Fontes Naturais	314	87,22	178	59,14	178	86,83
Problemas Reprodutivos	Abortos	4	1,11	4	100,00	4	1,95
	Natimortos	1	0,28	1	100,00	1	0,49
	Sem Ocorrência	355	98,61	200	56,34	200	97,56
Categoria Animal	Cordeiros	62	17,22	33	53,23	33	16,09
	Gestantes	80	22,22	51	63,75	51	24,88
	Vazias	84	23,33	44	52,38	44	21,46
	Cria ao pé	90	25	56	62,22	56	27,32
	Machos Inteiros	17	4,72	7	41,18	7	3,41
	Machos Castrados	27	7,5	14	51,85	14	6,83
TOTAL		360	100	205	-	205	100

¹ Relação entre o número de animais positivos por categoria e o número total de animais dentre cada categoria.

² Relação entre o número de animais positivos dentre cada categoria e o número total de animais positivos.

* Hampshire Down e Texel.

Tabela 2 - Resultados obtidos por meio de ELISA, na pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos, no município de Lages, SC, no período de agosto de 2008 a julho de 2009, por variável analisada e total.

Variáveis	Categoria	Animais		Positivo ¹		Positivo ²	
		n	%	n	%	n	%
Idade	0-6 meses	62	17,22	18	29,03	18	11,76
	7-12 meses	64	17,78	18	28,13	18	11,76
	≥ 13 meses	234	65,00	117	50,00	117	76,47
Sexo	Machos	72	20,00	29	40,28	29	18,95
	Fêmeas	288	80,00	124	43,06	124	81,05
Raça	Raça Definida*	169	46,94	75	44,38	75	49,02
	Mestiços	191	53,06	78	40,84	78	50,98
Contato com Felinos	Sim	275	76,39	127	46,18	127	83,01
	Não	85	23,61	26	30,59	26	16,99
Dieta	Campo Nativo	110	30,56	58	52,73	58	37,91
	Mista	188	52,22	77	40,96	77	50,33
	Leite Materno e Campo Nativo	62	17,22	18	29,03	18	11,76
Fonte de Água	Bebedouros	46	12,78	33	71,74	33	21,57
	Açudes e Fontes Naturais	314	87,22	120	38,22	120	78,43
Problemas Reprodutivos	Aborto	4	1,11	4	100,00	4	2,61
	Natimortos	1	0,28	0	0	0	0
	Não Ocorrência	355	98,61	149	41,97	149	97,39
Categoria Animal	Cordeiros	62	17,22	19	30,65	19	12,42
	Gestantes	80	22,22	46	57,50	46	30,07
	Vazias	84	23,33	24	28,57	24	15,69
	Cria ao pé	90	25	44	48,89	44	28,76
	Machos Inteiros	17	4,72	10	58,82	10	6,54
	Machos Castrados	27	7,5	10	37,04	10	6,54
	TOTAL		360	100	153	-	153

¹ Relação entre o número de animais positivos por categoria e o número total de animais dentre cada categoria.

² Relação entre o número de animais positivos dentre cada categoria e o número total de animais positivos.

* Hampshire Down e Texel.

Tenter, Heckerroth e Weiss (2000) relataram que a frequência de anticorpos na população ovina de diversos países variou de 0 a 92%. No Brasil, os valores descritos de soropositividade para *T. gondii*, em ovinos, variaram de 15,2% (ESCOPELLI, 2004) na região da Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul a 54,6% (OGAWA et al., 2003) na microrregião de Londrina, Paraná. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo estão próximos ao maior percentual descrito no Brasil. Cavalcante et al. (2004) encontraram prevalência de 46,8% em rebanhos ovinos de Monte Negro, Rondônia. Em Guarapuava, Paraná, Romanelli (2002) observaram uma prevalência de 51,47%. Valores mais baixos têm sido observados no Brasil e em outros países. No Rio Grande do Sul, em diferentes municípios, Amaral, Santos e Rebouças (1978), Zonta et al. (1987) e Pappen (2008) encontraram prevalência de 23%, 18,2% e 20,2%, respectivamente. Na Bahia, Gondim et al. (1999) encontraram uma frequência de 18,75% nos ovinos estudados. Gorman et al. (1999) no Chile, Masala et al. (2003) na Sardenha, Itália e Sawadogo et al. (2005) em Marrakech, Marrocos, obtiveram frequências de 28%, 28,4% e 27,6%, respectivamente.

Utilizando-se dos resultados sorológicos obtidos por meio da RIFI, observou-se em relação à idade que entre zero e seis meses, 53,23% (33/62) dos animais foram positivos; de sete a doze meses 45,31% (29/64) e idade igual ou superior a treze meses 61,11% (143/234). Com os dados do ELISA o percentual de positivos entre zero e seis meses foi de 29,03% (18/62); de sete a doze meses 28,13% (18/64) e idade igual ou superior a treze meses 50% (117/234). A amostra foi composta principalmente de animais com idade igual ou superior a treze meses (65%). A idade mais avançada torna-se um fator de risco, pelo fato de animais adultos terem maiores chances de contato com oocistos de *T. gondii* no ambiente. Este fato, não foi constatado nos resultados obtidos pela RIFI, pois a idade dos ovinos não mostrou ser um fator de risco correlacionado com a soropositividade para *T. gondii*, já que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Já a variável idade, quando analisada pelos dados da reação de ELISA, mostrou diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), pois ovinos com idade igual ou superior a treze meses apresentaram uma maior taxa de prevalência, quando comparados aos animais das outras duas faixas etárias. As maiores taxas em animais mais velhos estão de acordo com os trabalhos de O' Donoghue, Riley e Clarke (1987) no Sul da Austrália; Gorman et al. (1999) no Chile; Garcia et al. (1999) no Paraná; Van der Puije et al. (2000) em Gana; Figliuolo et al. (2004) em São Paulo; Carneiro (2006) em Minas Gerais, Romanelli et al. (2007), no estado do Paraná e Mucalane Tembue et al. (2009), na região seca do estado de Pernambuco. No presente estudo ficou evidente que as técnicas podem apresentar pequenas diferenças diagnósticas, refletindo na análise estatística e,

consequentemente, nos resultados.

De acordo com os resultados da RIFI, observou-se que 52,78% (38/72) dos machos e 57,99% (167/288) das fêmeas foram positivos. Pelo ELISA, o percentual de machos positivos foi de 40,28% (29/72) e o de fêmeas 43,06% (124/288). Nas duas técnicas não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre a soropositividade dos animais e o sexo dos mesmos. Os resultados estão de acordo com a maioria dos trabalhos sobre prevalência em ovinos (SAMAD; RAHMAN; HALDER, 1993; GORMAN et al., 1999; ESCOPELLI, 2004; CARNEIRO, 2006). Resultados discordantes foram obtidos por Silva et al. (2003); Ueno (2005); Ragozo et al. (2007) em Pernambuco, Distrito Federal e São Paulo, respectivamente, com maior soropositividade encontrada em ovinos machos e, por Van der Puije et al. (2000) em fêmeas ovinas de Gana que apontam o sexo feminino como um fator de risco para a toxoplasmose devido a diferenças hormonais, fisiológicas e de manejo. Para Ueno (2005) a divergência de resultados e, principalmente por não haver uma explicação biológica coerente, suspeita-se que essa variável não influencia os resultados, sendo este fato derivado do acaso.

Com relação ao tipo racial na RIFI, constatou-se que 62,83% (120/191) dos ovinos mestiços e, 50,29% (85/169) dos com raça definida foram positivos, enquanto que pelo ELISA, 40,84% (78/191) dos mestiços e 44,38% (75/169) dos com raça definida foram sororreagentes. Com os resultados da RIFI houve diferença estatística significativa ($p\leq 0,05$) entre a infecção por *T. gondii* e a raça dos ovinos, sendo que os mestiços apresentaram maior soropositividade. Estes resultados concordam com os obtidos por Silva et al. (2003) que encontraram maiores taxas de infecção em animais mestiços, podendo, segundo os autores, este comportamento ser devido ao menor cuidado no manejo higiênico sanitário das criações de animais mestiços. Com os dados do ELISA a análise da proporção de animais apresentando anticorpos contra *T. gondii* não mostrou diferença estatística significativa ($p>0,05$), entre os dois tipos raciais analisados, concordando com Van der Puije et al. (2000) e com Carneiro (2006).

A variável, contato com gatos, refere-se à presença de gatos domésticos na propriedade. Gatos errantes e felídeos silvestres não foram categorizados dentro desta variável, por terem hábitos e características de habitat diferentes dos domiciliados, não sendo tão estreita sua relação com os ovinos. Na RIFI, em propriedades com presença e/ou ovinos em contato com felinos, 56,36% (155/275) foram positivos e em propriedades sem gatos domésticos 58,82%, (50/85). De acordo com os resultados obtidos pelo ELISA, em propriedades com presença e/ou ovinos em contato com felinos, 46,18% (127/275) foram positivos e em propriedades sem gatos domésticos 30,59% (26/85). Neste estudo, nas duas

técnicas, não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre a presença e/ou ovinos em contato com felinos e a soropositividade dos animais, concordando com os dados obtidos por Soares et al. (2009), que utilizaram a RIFI (1:64) em 409 amostras de soro ovino no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. Estes resultados discordam dos obtidos por Romanelli et al. (2007), no estado do Paraná e Pappen (2008), na região Sul do Rio Grande do Sul. Estes autores afirmaram que o acesso dos gatos ao depósito de ração dos ovinos, nas propriedades, representa significativo fator de risco. Skjerve et al. (1998) na Noruega, relataram que a presença de gatos jovens nos estábulos dos ovinos, foi fator de risco. Os autores afirmaram que a presença de gatos jovens e a criação de um grupo de ovinos, próximos à sede da propriedade, foram fatores relacionados a maiores chances de ingestão do oocisto no ambiente. Considerando a relação entre o total de animais positivos e os que apresentaram contato com felinos, 75,61% dos ovinos foram sororreagentes na RIFI (Tabela 1) e no ELISA 83,01% (Tabela 2), evidenciando por esta análise a importância do hospedeiro definitivo nos percentuais de positividade. Deve-se considerar que a infecção pode ocorrer no rebanho pela forma de transmissão congênita, porém Ogawa et al.(2003) sugerem que esta não é a principal forma de infecção, indicando que a transmissão horizontal é a mais importante. Segundo Hill e Dubey (2002), a presença ou ausência do hospedeiro definitivo tem grande reflexo na epidemiologia, já que a transmissão de *T. gondii* para os ovinos é principalmente atribuída à eliminação de oocistos nas fezes dos gatos sobre a pastagem e na água.

Na variável alimentação, pela RIFI, 63,64% (70/110) dos positivos alimentavam-se de campo nativo, 54,26% (102/188) de dieta mista e 53,23% (33/62) de leite materno e campo nativo. Pelo ELISA, 52,73% (58/110) dos ovinos positivos alimentavam-se de campo nativo, 40,96% (77/188) de dieta mista e, 29,03% (18/62) de leite materno e campo nativo. De acordo com os resultados da RIFI e do ELISA, não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) do tipo de dieta na soropositividade dos ovinos. Carneiro (2006), em Minas Gerais, também verificaram que a dieta oferecida aos animais não se constituiu num fator de risco de importância epidemiológica significativa.

Na variável fonte de água, pelos resultados da RIFI, 58,69% (27/46) dos positivos ingeriam água de bebedouros e 59,14% (178/314) de açudes e fontes naturais. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$). Pelo ELISA, 71,74% (33/46) dos positivos ingeriam água de bebedouros e 38,22% (120/314) de açudes e fontes naturais, com diferença estatística significativa ($p\leq 0,05$). Aramini et al. (1999), Romanelli et al. (2007) e Vesco et al. (2007) constataram correlação com fontes de água de superfície, mais sujeitas à contaminação

por oocistos, onde outros animais têm acesso e a soropositividade para *T. gondii*.

Na variável problemas reprodutivos, todas as quatro fêmeas que abortaram, no ano em que as coletas foram realizadas, apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* (Tabelas 1 e 2). Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) com os dados obtidos através da RIFI e do ELISA, entre os problemas reprodutivos (aborto e natimortalidade) e a soropositividade dos ovinos. O resultado está de acordo com o obtido por Ogawa et al. (2003), em estudo sobre a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos da região de Londrina, Paraná e com o trabalho desenvolvido em Minas Gerais, com pequenos ruminantes por Carneiro (2006).

Considerando-se a categoria animal, pela RIFI: 53,23% (33/62) dos cordeiros; 63,75% (51/80) das fêmeas gestantes; 52,38% (44/84) das fêmeas vazias; 62,22% (56/90) das fêmeas com cria ao pé; 41,18% (7/17) dos machos inteiros e 51,85% (14/27) dos machos castrados foram positivos. Não foi encontrada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre a categoria dos animais e a soropositividade para *T. gondii*. Pelo ELISA, 30,65% (19/62) dos cordeiros; 57,50% (46/80) das gestantes; 48,89% (44/90) das fêmeas com cria ao pé; 28,57% (24/84) das fêmeas vazias; 58,82% (10/17) dos machos inteiros e 37,04% (10/27) dos machos castrados foram positivos. Foi encontrada diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre a categoria dos animais e a soropositividade para *T. gondii*.

No presente estudo a variável sistema de criação não pôde ser avaliada, uma vez que se observou o sistema semiextensivo em 100% das propriedades.

A utilização de ELISA e RIFI como testes sorológicos são boas opções para levantamentos epidemiológicos da toxoplasmose ovina graças à praticidade, sensibilidade e especificidade destas duas técnicas (ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1997; SAWADOGO et al., 2005).

Tabela 3 - Valores utilizados para avaliação da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo, (VPN), concordância Kappa e eficácia do ELISA utilizando como reação de referência a RIFI (1:64) em 360 soros de ovinos do município de Lages, SC, Brasil.

Resultado ELISA	Resultado RIFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	125	28	153
Negativo	80	127	207
Total	205	155	360

S= 61%; E=82%; VPP=81,6%; VPN=61,3%; Concordância Kappa= 0,7; Eficácia=70%.

A sensibilidade de um método de diagnóstico é a proporção de positivos verdadeiros que são detectados por esse método, e a especificidade é a proporção de negativos verdadeiros que são detectados pela técnica (THRUSFIELD, 2004). A sensibilidade (61%) e a especificidade (82%) do ELISA, tendo como referência a RIFI na diluição 1:64 (Tabela 3), são similares aos valores encontrados por Van der Puije et al. (2000), que também utilizaram a RIFI e o ELISA em estudos de prevalência realizados em rebanhos ovinos em Gana, na África. Shaapan, El-Nawawi e Tawfik (2008) constataram em ovinos de propriedades do Cairo, no Egito, prevalências de anticorpos contra *T. gondii* de 37% através da RIFI e 41,7% pelo ELISA; sensibilidades de 90,1% no ELISA e 80,4% na RIFI e especificidades de 91,4% na RIFI e 85,9% no ELISA.

Quando se utiliza um teste sorológico ou outro teste de triagem para determinar a presença da doença em uma população, é importante saber a probabilidade de que um animal positivo de acordo com o teste seja positivo verdadeiro; e também que um animal com teste negativo, seja negativo verdadeiro. Essas probabilidades são os valores preditivos do teste. O parâmetro mais usado para estabelecer o valor preditivo de um teste, é o valor preditivo de um resultado positivo de teste em oposição ao negativo. O valor preditivo depende da especificidade, sensibilidade e prevalência. A sensibilidade e a especificidade são características inatas de um teste e (por uma definição do ponto de corte) não variam, mas a prevalência da enfermidade na população testada afetará a proporção de animais com testes positivos, que estão realmente doentes (THRUSFIELD, 2004).

Se não há um padrão ouro disponível, a estatística Kappa é a única possibilidade de se avaliar a concordância entre testes diferentes, sem assumir que um teste é o melhor. A lógica desse enfoque é que a concordância entre os testes é evidência de validade, enquanto a não concordância sugere que os testes não são confiáveis (THRUSFIELD, 2004). Kappa tem valor de 1 (concordância completa) a 0 (concordância igual àquela por casualidade), enquanto resultados negativos indicam concordância menor que a casual. Arbitrariamente, os níveis de

comparação para avaliar o Kappa observado são: > 0,81: concordância quase perfeita; 0,61 a 0,8: concordância substancial; 0,41 a 0,6: concordância moderada; 0,21 a 0,4: concordância razoável; 0 a 0,2: concordância fraca; 0: concordância pobre (EVERITT, 1989).

No presente trabalho, o ELISA realizado nos soros ovinos mostrou-se mais específico que sensível. A concordância substancial (Kappa= 0,7) entre o ELISA e a RIFI (1:64) permite considerar o ELISA como técnica adequada para o diagnóstico de *T. gondii* na espécie ovina. Pereira-Bueno et al. (2004) constataram uma perfeita concordância entre a RIFI e o ELISA (Kappa= 1,00) em estudo com ovinos realizado na Espanha, já Escopelli (2004) trabalhando com ovinos no Rio Grande do Sul, através das técnicas HAI e RIFI obteve índice Kappa de 0,513, mostrando uma concordância moderada entre as duas técnicas. Carneiro (2006) em Minas Gerais comparando ELISA e RIFI (1:64) o índice Kappa mostrou concordância substancial (0,68).

CONCLUSÕES

- A infecção por *Toxoplasma gondii* está amplamente distribuída em rebanhos ovinos no município de Lages, Santa Catarina, com animais positivos em 100% das propriedades.

- Os ovinos no município de Lages, Santa Catarina, apresentam alta prevalência de *Toxoplasma gondii*, 56,94% pela RIFI e 42,50% pelo ELISA, representando risco de infecção humana.

- Os fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* pelo ELISA foram as variáveis: idade, fonte de água e categoria animal e pela RIFI, tipo racial.

- Foi constatada sensibilidade de 61%, especificidade de 82% e concordância Kappa de 0,7 considerada boa, permitindo indicar o ELISA como técnica adequada para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii* na espécie ovina.

REFERÊNCIAS

- AGANGA, A. O. et al. Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal Animal Production Research**, v.8, n.2, p.104-120, 1988.
- AMARAL, V.; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M. M. Sobre a prevalência de anticorpos anti *Toxoplasma* em soros de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil. **O Biológico**, v.45, p.331-340, 1978.
- ANDERSON, M. L.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. **Veterinary Clinics of North America**, v.10, n.3, p. 439-461, 1994.
- ARAMINI, J. J. et al. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Epidemiology and Infection**, v.122, p.305-315, 1999.
- BAHIA, M. T. **Avaliação da sorologia para o diagnóstico epidemiológico da Toxoplasmose Caprina**. 1993.215 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- BAHIA, M.T. et al. Avidéz de anticorpos específicos anti *Toxoplasma* da classe IgG e sua utilização na diferenciação entre toxoplasmose recente e crônica em caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.32, n.11-16, 1995.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.1, p.55-62, 2003.
- BEVERLEY, J. K. A.; WATSON, W. A. Prevention of experimental and of naturally occurring ovine abortion due to toxoplasmosis. **The Veterinary Record**, v.88, n.2, p.39-41, 1971.
- BEVERLEY, J. K. A.; WATSON, W. A.; PAYNE, J. M. The pathology of the placenta in ovine abortion due to toxoplasmosis. **The Veterinary Record**, v.88, n.5, p.124-128, 1971.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.607-623, 2000.
- BLEWETT, D. A.; MILLER, J. K.; BUXTON, D. Response of immune and susceptible ewes to infection with *Toxoplasma gondii*. **The Veterinary Record**, v.111, n.9, p.175-177, 1982.
- BLEWETT, D. A.; WATSON, W. A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. Possible sources of infection in outbreaks of clinical disease. **British Veterinary Journal**, v.139, n.6, p.546-555, 1983.

BLEWETT, D. A.; WATSON, W. A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. Observations on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. **British Veterinary Journal**, v.140, n.1, p.54-63, 1984.

BONAMETTI, A. M. et al. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.1, p.21-25, 1997.

BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research**, v.29, n.3-4, p.289-310, 1998.

BUXTON, D.; FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. **Journal of Comparative Pathology**, v.96, n.3, p.319-333, 1986.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.6, n.3, p.117-118, 1964.

CAMOSSI, L. G. **Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pelo Método de Aglutinação Direta Modificado e pesquisa do agente no leite de ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii***. 2010. 131p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

CARNEIRO, A. C. A. V. **Soroepidemiologia da Toxoplasmose Caprina e Ovina no Estado de Minas Gerais**. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v.81, p.111-122, 2002.

CAVALCANTE, A. C. R. **Toxoplasmose Caprina no Ceará: Soroepidemiologia e Caracterização de Cepas de *Toxoplasma gondii***. 2004. 129 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

CHIARI, C. A. et al. Reações de Imunofluorescência Indireta e de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em soros de caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, p.587-600, 1985.

CHIARI, C. A. et al. Soroepidemiologia da Toxoplasmose Caprina em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, p.587-600, 1987.

CHIARI, C. A. **Soroepidemiologia da Toxoplasmose Caprina**. 1981.131f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1981.

CHIARI, C. A.; LIMA, J. D.; LIMA, W. S. Anticorpos Circulantes e Caprinos Naturalmente Infectados pelo *Toxoplasma gondii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.38, p.889-898, 1986.

CHIARI, C. A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, n.3, p.337-340, 1984.

CIDASC. Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina. Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária (ICASA), SC, 2008.

CONDE, M. et al. Analysis of IgG response to experimental infection with RH *Toxoplasma gondii* in goats. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, p.197-206, 2001.

COSTA, T. L. et al. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose. **NewsLab**, v.85, 2007.

DE SILVA, L. M.; MULCAHY, D. L.; KAMATH, K. R. A family outbreak of toxoplasmosis: a serendipitous finding. **Journal of Infection**, v.08, p.163-167, 1984.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital Toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. **New England Journal of Medicine**, v.290, n.20, p.1110-1116, 1974.

DUBEY, J. P. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.267-299, 1998.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v.64, p.65-70, 1996.

DUBEY, J. P. et al. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v.13, n.3, p.199-211, 1983.

DUBEY, J. P. et al. Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.196, n.2, p.259-262, 1990.

DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v.90, p.721-726, 2004.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. IN: KREIER, J. P. **Parasitic protozoagregarines, haemogregarines, coccidia, plasmodia and haemoproteids**. New York: Academic Press, 1977. v.3, p.101-137.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.205, n.11, p.1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988, 220p.

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

DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. Epizootics of ovine abortion due to *Toxoplasma gondii* in north central United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.657-660, 1984.

DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. Toxoplasmosis and other causes of abortations in sheep from north central United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.196, n.2, p.287-290, 1990.

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

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

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

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle feed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.2, p.270-273, 1993.

EPI INFO, VERSION 6: a word processing, database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, 1996.

ESCOPELLI, K. S. **Avaliação sorológica de anticorpos da classe IgG para *Toxoplasma gondii* em soros de ovinos da região da Grande Porto Alegre/RS, através das técnicas de hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI)**. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2004.

ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. **Comparative Immunology Microbiology Infectus Disease**, v.20, n.2, p.191-196, 1997.

EVERITT, R.S. **Statistical Methods for Medical Investigations**. Oxford University Press, New York/ Edward Arnold, London, 1989.

FERREIRA ISABEL, T. **Toxoplasmose Aguda em Gestantes de Araraquara, SP: avaliação da aplicabilidade do teste de avidéz de IgG anti *Toxoplasma***. 2006. 88f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

FIGLIUOLO, L. P. C. et al. Prevalence of anti *Toxoplasma gondii* and anti *Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p. 161-166, 2004.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'istituto Superior di Sanità**, v.40, p.71-80, 2004.

FREIRE, R. L. et al. Levantamento soroepidemiológico da toxoplasmose em ovinos da região de Londrina-PR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.4, p.609-612, 1995.

FREIRE, R. L. et al. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (iscoms). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p. 388-396, 2003.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. *Hammondia hammondi* gen. nov., sp. nov., from Domestic cats, a New Coccidian Related to *Toxoplasma* and *Sarcocysts*. **Parasitology Research**, v.46, n.1, p.3-12, 1975.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis and its prevention in cats and mans. **The Journal of Infectious Diseases**, v.126, n.6, p.664-666, 1972.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v.167, n.919, p.893-896, 1970.

FREYRE, A. et al. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.81, n.1, p.85-88, 1999.

GARCIA, J. L. et al. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.129, n.3-4, p.209-217, 2005.

GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná – Brasil. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.91-97, 1999.

GARCIA, J. L. et al. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v.113, p.100-105, 2006.

GARCIA, J. L. Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. **Expert Review of Vaccines**, v.8, p.215-225, 2009.

GARCIA-VAZQUEZ, Z. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. **Preventive Veterinary Medicine**, v.17, p.127-132, 1993.

GONDIM, L. F. P. et al. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999.

GORMAN, T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and alpacas (*Llama pacos*) in Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, n. 3-4, p.143-149, 1999.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Annali dell' nstituto Superior di Sanità**, v.40, p.65-70, 2004.

HARTLEY, W. J. et al. New Zeland type II abortion in ewes. **The Australian Veterinary Journal**, v.30, n.7, p.216-218, 1954.

HASHEMI-FESHARKI, R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. **Veterinary Parasitology**, v.61, n.1-2, p.1-3, 1996.

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

HUFFMAN, E. M. et al. Relationship of neonatal mortality in lambs to serologic status of ewe for *Toxoplasma gondii*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.178, n.7, p.679-682, 1981.

HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v.206, n.987, p.961-962, 1965.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2000 – Cidades**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/censo>> Acesso em: 10 jan.2010.

ITO, S. et al. Detection and confirmation of *Toxoplasma* oocysts in the soil. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.37, p.549-554, 1975.

JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v.28, p.55-105, 1989.

JITTAPALAPONG, S. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.17-22, 2005

JONES, J. L. et al. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v.56, p.296-305, 2001.

KLUN, I. et al. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. **Veterinary Parasitology** v.135, n.2, p.121-131, 2006.

KOSKI, V. H. Evaluation of ELISA for the detection of *Toxoplasma* antibodies in swine sera. **Acta Veterinary Scandinavian**, v. 31, p.413–422, 1990.

LAGES. Prefeitura do Município de Lages. Secretaria do Planejamento do Município de Lages (SEPLAN), SC, 2007.

LANGONI, H. et al. Inquérito soropidemiológico para toxoplasmose em ovinos do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.61, p.35-39, 1999.

LARSSON, C. E. et al. Prevalência de toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.14, n.4, p.582-588, 1980.

LOPES, et al., Soroprevalência e fatores de risco para *T. gondii* em ovinos criados na microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo, Brasil. **Investigação em Ciências Veterinárias**, v.88, n.1, p.104-106, 2010.

LOPES, W. D. Z. **Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*Ovis aries*) machos experimentalmente infectados**. 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

LUFT, R. Z.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis. **Journal of Infectious Diseases**, v.157, p.1-6, 1988.

MAGALDI, C. et al. Surto de Toxoplasmose em um Seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo). Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública/Faculdade de Saúde Pública**, Universidade de São Paulo, v.1, p.141-171, 1967.

MAINARD, R. S. et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.759-761, 2003.

MALIK, M. A.; DEENSEN, D. W.; CRUZ, A. Toxoplasmosis in sheep in northeastern United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 263–265, 1990.

MARQUES, L. C.; COSTA, A. J. Infecção experimental de ovinos com oocistos e cistos de *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, XVIII, 1982, Balneário Camboriú. Anais. Balneário Camboriú, Brasil, 1982. 202p.

MASALA, G. et al. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. **Veterinary Parasitology**, v.117, p. 15-21, 2003.

McALLISTER, M. M. A. et al. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v.132, n.3-4, p.241-247, 2005.

McDONALD, J. C. et al. An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Quebec. **Journal of Infectious Diseases**, v.161, p.769-774, 1990.

McEARLEAN, B. A. Ovine paralysis associated with spinal lesions of toxoplasmosis. **The Veterinary Record**, v.94, n.12, p.264-266, 1974.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Seminar**, v.363, p.1975-1976, 2004.

MOURA, A. B. et al. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.1, p.54-56, 2007.

MOURA, A. B. et al. *Toxoplasma gondii* no sêmen de suínos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.430-434, 2007.

MUCALANE TEMBUE, A. A. et al. Prevalence of IgG antibodies anti *Toxoplasma gondii* in goat and sheep from dry region of Pernambuco State, Brazil. **Revista Iberolatinoamericana de Parasitología**, v.1, p.82-85, 2009.

NAVARRO, I. T. et al. *Toxoplasma gondii*: isolamento em carnes e cérebro de suínos. **Semina: Revista cultural e científica da Universidade Estadual de Londrina**, v.13, p.10-15, 1992.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu. 2004. p.147-156.

NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academic des Sciences, Paris**, v. 148, p.369-372, 1909.

NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academic des Sciences, Paris**, v.147, p.763-766, 1908.

O'DONOGHUE, P. J.; RILEY, M. J.; CLARKE, J. F. Serological survey for *Toxoplasma* infections in sheep. **The Australian Veterinary Journal**, v.64, n.2, p.40-45, 1987.

O'ROURKE, K. Zoonotic risk of pest: how to handle questions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.220, n.10, p.1439-1442, 2002.

OGAWA, L. et al. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in sheep from the Londrina Region of the Paraná State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.1, p.57-62, 2003.

OLAFSON, P.; MONLUX, W. S. *Toxoplasma* infection in animals. **Cornell Veterinary Medicine Research**, v.32, p.316-326, 1942.

PAPPEN, F. G. **Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) em ovinos da região sul do Estado do Rio Grande do Sul.** 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Veterinária Preventiva) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, n.2, p.273-275, 1995.

PASSOS, L. N.; ARAÚJO FILHO, O. F.; ANDRADE JUNIOR, H. F. Toxoplasmosis encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.141-145, 2000.

PEREIRA-BUENO, J. et al. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.33-43, 2004.

PITA-GONDIM, L. F. et al. Serological survey of antibodies of *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999.

PIZZI, H. L. Toxoplasmosis. **Rhône Poulenc Rourer Argentina**, 91f., 1997.

PLANT, J. W.; FREEMAN, P.; SAUNDERS, E. Serological survey of the prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rams in sheep flocks in New South Wales. The **Australian Veterinary Journal**, v.59, n.3, p.87-89, 1982.

POTASMAN, I. et al. *Toxoplasma gondii* antigens recognized by sequential sample of serum obtained from congenitally infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.10, p.1926-1931, 1987.

PRADHAN, S.; YADAV, R.; MISHRA, V. N. *Toxoplasma* meningoencephalitis in HIV-seronegative patients: clinical patterns, imaging features and treatment outcome. **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, n.1, p.25-33, 2007.

RAGOZO, A. M. A. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos.** 2007. 114f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico. Aplicações Clínicas de Dados Laboratoriais**. Rio de Janeiro, 6 ed., 1998.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.941-945, 2001.

REY, L. C.; RAMALHO, I. L. C. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.41, n.3, p.171-174, 1999.

REY, L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. **Parasitologia – Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856p, p.321-334, cap.25.

ROBSON, J. M. B. et al. A probable foodborne outbreak of toxoplasmosis. **Communicable Diseases Intelligence**, v.19, p.517-522, 1995.

ROMANELLI, P. R. **Avaliação soropidemiológica de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos do município de Guarapuava-Paraná**. 2002. 53f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

ROMANELLI, P. R. et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202-207, 2007.

ROSSI, G. F.; CABRAL, D. D. Frequência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos do município de Uberlândia, Minas Gerais. **Seminário de Iniciação Científica, XII, Encontro Interno, VIII**, 2008, Uberlândia.

SAAD, R. et al. Pulmonary toxoplasmosis after allergenic bone marrow transplantation: case report and review. **Bone Marrow Transplant**, v.18, n.1, p.211-212, 1996.

SAGER, H. et al. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. **Parasitology Research**, v.91, p.171-174, 2003.

SAMAD, M. A.; RAHMAN, K. B.; HALDER, A. K. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic ruminants in Balgladesh. **Veterinary Parasitology**, v.47, n.1-2, p. 157-159, 1993.

SAVIO, E.; NIETO, A. Ovine toxoplasmosis: seroconversion during pregnancy and lamb birth rate in Uruguayan sheep flocks. **Veterinary Parasitology**, v.60, n.3-4, p.241-247, 1995.

SAWADOGO, P. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep from Marrakech, Marocco. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.89-92, 2005.

SCARPELLI, L. et al. *Toxoplasma gondii* em sêmen e tecidos de *Bos taurus* e *Bos indicus* experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.59-64, 2009.

SERRA-FREIRE, N. M.; NORBERG, A. N.; GAZETA, G. S. Toxoplasmose caprina no Rio de Janeiro. **Parasitologia al Día**, v.18, p.77-81, 1994.

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

SILVA, A. V. et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.115-119, 2003.

SILVA, A. V.; CUTOLO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da Reação de Imunofluorescência Indireta e do Método de Aglutinação Direta na detecção de anticorpos anti *Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.69, p.7-11, 2002.

SILVEIRA, C. A. M. Toxoplasmose: Dúvidas e Controvérsias. Erechim: Edipafes, 2002. 152f.

SKJERVE, E. et al. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. **Preventive Veterinary Medicine**, v.35, p.219-227, 1998.

SOARES, H. S. et al. Prevalence of anti *Toxoplasma gondii* and anti *Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.3-4, p.211-214, 2009.

SPLENDORE, D. A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Revista Sociedade Científica São Paulo**, v.3, p.109-112, 1908.

STRAY-PEDERSEN, B. Toxoplasmosis in pregnancy. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.7, n.1, p.107-137, 1993.

TEALE, A. J. et al. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of *toxoplasma*. **The Veterinary Record**, v.111, n.3, p.53-55, 1982.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p. p.323-346, cap. 17.

TODD, E. C. D. Preliminary estimates of costs in foodborne disease in the United States. **Journal of Food Protection**, v.52, p.595-601, 1989.

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

UZÊDA, R. S. et al. Fatores relacionados à presença de anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros do Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.5, p. 1-8, 2004.

VAN DER PUIJE W. N. A. et al. The prevalence of anti *Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. **Acta Tropica**, v.76, n.1, p.21-26, 2000.

VESCO, G. et al. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 3-8, 2007.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: Epidemiologia e Importância da Doença na Saúde Animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v.13, p.69-75, 1992.

VITOR, R. W. A; PINTO, J. B.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através da urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.147-154, 1991.

WALSH, C. P. et al. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, n.5, p.73, 1999.

ZONTA, J. C. et al. Prevalência de anticorpos toxoplasmáticos em ovinos de Marau e de Uruguaiana, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 15, p. 59-61, 1987.

