

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Veterinária  
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

**AVALIAÇÃO DO HAMSTER (*Mesocricetus auratus*) COMO MODELO  
EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA TRANSMISSÃO CONGÊNITA  
DO *Toxoplasma gondii* DURANTE AS FASES CRÔNICA E AGUDA  
DA INFECÇÃO E DA TRANSMISSÃO LACTOGÊNICA.**

LORENA EVA BIGATTI

Porto Alegre

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS –GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DO HAMSTER (*Mesocricetus auratus*) COMO MODELO  
EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA TRANSMISSÃO CONGÊNITA  
DO *Toxoplasma gondii* DURANTE AS FASES CRÔNICA E AGUDA  
DA INFECÇÃO E DA TRANSMISSÃO LACTOGÊNICA .**

LORENA EVA BIGATTI

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós Graduação da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul como um dos pré-  
requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araújo.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética da  
Faculdade de Veterinária da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2007





Para  
Eduardo, Gabriel e Honey

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Prof. Dr. Flávio Antonio Pacheco de Araújo, pela sábia orientação, pelo apoio, confiança, amizade e pelo estímulo que me ofereceu.

Ao meu Orientador colaborador Prof. Dr. Álvaro Freyre, (Professor Agregado de Parasitologia de La Universidad de la Republica Facultad de Veterinaria Montevideo- Uruguay), pela orientação sempre presente, pela precisão de envio dos materiais, de suma importância e da realização das técnicas de AD (aglutinação direta ) em Montevideo.

A Dra. Sandra Tietz Marques, pelo apoio, confiança, amizade, conhecimento e estímulo sempre presentes.

As colegas de Laboratório Thanara Louzada, Luciane Dubina, Cristina Fialho, Jairo de Jesus, os quais foram muito importantes para mim durante o Mestrado.

A toda equipe do Pós Graduação que sempre foram gentis e prestativas para comigo,

À Faculdade de Veterinária por ter me proporcionado este aprimoramento como profissional e reforçou em mim a convicção que devemos sempre tentar nos aprimorar através do estudo para que nosso saber se amplie cada vez mais, para nossa capacitação como profissional e ser humano.

Aos Hamster, animais dóceis e tão prestativos que aprendi muito sobre eles.

Aos professores da Faculdade de Veterinária que sempre me receberam com muito carinho e de portas abertas.

Ao meu Pai Salvatore Roberto Bigatti, pelo exemplo de homem bom e humano, amante da natureza e dos animais

A minha Mãe Ines Bonomi Bigatti, pelos ensinamentos e exemplos importantes aos quais pude buscar sempre o meu melhor.

Ao meu irmão Alberto Pietro Bigatti, que sempre esteve presente e é muito importante para mim.

À Equipe da Clínica Veterinária Moinhos de Vento pela compreensão e carinho sempre presentes, em especial a Viviane Bargmann que esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao Eduardo pelo estímulo, pelo amor e carinho sempre presentes, ao Gabriel um milagre em minha vida, a Honey um exemplo de amor.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
3.1 Definição.....	18
3.2 Histórico.....	18
3.3 Taxonomia.....	19
3.4 Morfologia.....	19
3.5 Ciclo Biológico.....	19
3.6 Transmissão.....	20
3.7 Sinais Clínicos.....	21
3.7.1 Humanos.....	21
3.7.2 Animais.....	23
3.8 Imunidade e Patogenicidade.....	25
3.9 Diagnóstico.....	27
3.10 Profilaxia.....	27
3.11 Modelos experimentais para o estudo de Toxoplasmose.....	28
<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Obtenção de oocistos de <i>Toxoplasma gondi</i> .....	32
4.2 Medidas para a proteção biológica das pessoas envolvidas no projeto de trabalho.....	32
4.3 Cepas de toxoplasma.....	32
4.4 Método para detectar gestação.....	33
4.5 Bioensaio.....	33

<b>5 EXPERIMENTOS</b> .....	34
5.1 EXPERIMENTO 1.....	34
5.2 EXPERIMENTO 2.....	35
<b>6. RESULTADO</b> .....	46
<b>6.1 RESULTADO DO EXPERIMENTO 1</b> .....	46
<b>6.2 RESULTADO DO EXPERIMENTO 2</b> .....	47
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Aglutinação Direta
HAI	Hemaglutinação Indireta
IFN- $\gamma$	interferon Gama
IgM	imunoglobulina M
IgG	imunoglobulina G
IgA	imunoglobulina A
NaCl 0,5%	Cloreto de Sódio a cinco por cento
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
T. gondii	<i>Toxoplasma gondii</i>
UI	Unidades Internacionais

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Aglutinação direta dos soros de fêmeas Inoculadas via oral com 40 oocistos da cepa ME49 de *T. gondii*, 60 dias antes de serem alojadas com os machos..... 46

**Tabela 2** Aglutinação direta dos soros de fêmeas Inoculadas com  $10^2$  oocistos de *T.gondii* (cepa Prugniaud via oral). E aglutinação direta de soros de seus filhotes e do soro de alguns filhotes adotados..... 47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Placa de HAI.....	36
<b>Figura 2</b>	Local dos experimentos.....	37
<b>Figura 3</b>	Cânula especial.....	37
<b>Figura 4</b>	Diferenças morfológicas.....	38
<b>Figura 5</b>	Casal de Hamsters.....	38
<b>Figura 6</b>	Casal copulando.....	38
<b>Figura 7</b>	Fêmea e seus filhotes.....	39
<b>Figura 8</b>	Recém-nascidos.....	39
<b>Figura 9</b>	Recém- nascido.....	40
<b>Figura 10</b>	Preparação para retirada de órgãos.....	40
<b>Figura 11</b>	Retirando pulmões.....	41
<b>Figura 11.1</b>	Sequência da retirada de órgãos.....	41
<b>Figura 11.2</b>	Separando órgãos.....	41
<b>Figura 12</b>	Preparando inóculo para bioensaio.....	42
<b>Figura 12.1</b>	Preparando inóculo para bioensaio.....	42
<b>Figura 13</b>	Inoculação em camundongo.....	43
<b>Figura 14</b>	Retirando sangue camundongo.....	43
<b>Figura 15</b>	Armazenando sangue.....	43
<b>Figura 16 e 16.1</b>	Pesagem em balança de precisão.....	44
<b>Figura 17</b>	Administrando inóculo VO hamster.....	44
<b>Figura 18</b>	Retirando sangue hamster.....	45

## RESUMO

A Toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita que ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimidos, gestantes e em pacientes em terapia anti-câncer. Na Medicina Veterinária, animais como ovelhas, cabras e porcos são seriamente afetados podendo ocorrer abortos e com isto perdas significativas em termos econômicos. Atualmente não se dispõem de vacinas contra a toxoplasmose, mas tem-se desenvolvido modelos animais em ratas e camundongos para o ensaio imunológico contra a enfermidade. Os modelos atualmente utilizados, possuem limitações, por exemplo, não é possível ensaiar no modelo rata um imunógeno de *Toxoplasma gondii*, uma vez que todas as linhagens de ratas disponíveis são resistentes. Portanto não se pode ensaiar desafios vacinais altamente exigentes neste modelo. Por isso é aconselhável contar com experimentos efetuados em diversas espécies animais. Está sendo proposto testar o Hamster (*Mesocricetus auratus*), com o intuito de estabelecer se é ou não um modelo que se aproxima das respostas esperadas nos humanos. Antes de se comprometer a custos muito elevados com ensaios finais de vacinações, o aconselhável é contar com ensaios em diversas espécies, pois os animais respondem de formas diferentes aos mesmos imunógenos. Na transmissão congênita crônica dez Hamsters foram inoculados com 40 oocistos por via oral da cepa Me-49 do *T.gondii* e após sessenta dias foram postas para cruzarem com os machos. Obteve-se resultados promissores uma vez que a transmissão congênita aos seus filhotes nesta fase crônica da infecção foi nula. Na transmissão congênita aguda da infecção, obteve-se 42,9% de taxa de transmissão de *T.gondii*. Não foi observada a transmissão lactogênica, do toxoplasma, na fase aguda da infecção.

## **ABSTRACT**

*Taxoplasmosis is a cosmopolitan disease that causes a lot of damage to immunocompromised people, pregnant women, patients who have had transplants and people undergoing anticancer therapy. Animals like sheep, goats and pigs are seriously affected causing abortions and consequently significant economic losses. This is why, the importance of studying the transmission, the mechanisms of transmission and the forms of infection. Currently, vaccines against toxoplasmosis are not available, but animals' models, in rats and mice, have been developed to an immune assay against this disease. These models considered to the study have some limitations, however it is not possible to apply a toxoplasma immune assay on a rat model, because it is a susceptible race and it has already been proven that rats are resistant to toxoplasma. We proposed to test the hamster (*Mesocricetua auratus*) with the intention of establishing if it is or not one model that approaches the same results expected on human beings, therefore before compromising high costs with final assays of vaccinations, the advisable thing to do is to turn to assays on diverse species, because animals have different answers to the same immune. We intended to test hamster (*Mesocricetus auratus*), with the intention of establishing if it is or no a model that approaches the expected answer from differential ways to the same strains. In the chronic congenital transmit, in Hamsters was obtained promising results because yours creates didn't present title when their organs (liver and lung), they were bioassayed in mice and twenty five days after they were bled and their serum tested with direct agglutination of Desmonts and Remington (1980), confirming that the passage wasn't made during the gestation of females infected before the conception. In the sharp congenital transmission of the infection, it was obtained 42,9% that passed to their descendants antibodies of *T. gondii*. In the lactogenic transmission, wasn't have title for *T.gondii**

## 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular responsável por altas morbidades e mortalidades em infecções congênitas e imunocomprometidos (Dunn *et al.*, 1999; Remington e Desmonts, 1990; Petersen *et al.*, 2001)

Em relação à Sistemática do *T. gondii*, o agente é classificado segundo o Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de Protozoologia (Levine *et al.* 1980).

Esses protozoários pertencem ao Filo Apicomplexa, pois, possuem o complexo apical (Freyre, 1989).

O *T. gondii* causa abortos em ovelhas, cabras, porcos e coelhos quando entram pela primeira vez em contato com o agente durante a gestação (Remington e Desmonts, 1990; Dubey e Beattie, 1988). A infecção pode ser assintomática em recém nascidos, podendo desenvolver sintomas no decorrer da vida, dependendo das seqüelas e da proporção em que o paciente foi afetado (Remington e Desmonts, 1990). A reativação de cistos latentes de *T. gondii* no cérebro é fatal em pacientes imunodeprimidos, como no caso de portadores da AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), durante terapias para câncer, ou pacientes que sofreram transplantes (Luft e Hafner, 1990).

A prevenção da toxoplasmose humana congênita se efetua geralmente de forma eventual, com base na detecção da infecção durante a gestação, e no tratamento das mães infectadas. Em mulheres que adquiriram a primeira infecção durante a gestação, 90% dos recém nascidos são assintomáticos (Spalding *et al.*, 2003), muitos desenvolvem lesões em algum momento de sua vida (Araújo, 1999).

Em algumas regiões de agricultores no sul do Brasil a soropositividade fica em torno de 100%, e em 18 % da população se evidenciam cicatrizes no globo ocular (Silveira *et al.*, 2001). Foi detectada alta prevalência (74,5%) da infecção por *T. gondii*, em uma população de mulheres grávidas no Rio Grande do Sul, e esta foi superior ao da América Latina, 50 a 60% (Frenkel, 1974), e próxima à observada em gestantes do Rio de Janeiro 78.7% (Coutinho. *et al* 1981).

Várias espécies animais podem ser utilizadas para experimentação do parasito, mas a infecção resultante pode variar em função da espécie utilizada, e principalmente da cepa de *T.gondii* e de sua forma de inoculação. (Freyre 2006, comunicação pessoal).

Os critérios de classificação quanto à virulência da cepa ainda são imprecisos, sendo classificadas como virulentas, pouco virulentas ou não virulentas. A infecção resultante pode ser aguda com 100% de mortalidade, em 5 a 7 dias com cepas de alta virulência (cepa RH), ou formas capazes de causar uma infecção mais crônica, variando de semanas ou meses com sintomatologia sistêmica, e predominância de sintomas cerebrais. Em alguns casos a infecção permanece completamente latente no organismo e se manifesta apenas pela presença de cistos. Algumas espécies de animais possuem uma resistência natural importante ao parasito, como o rato, que pode tolerar inoculações elevadas de cepas RH, produzindo uma infecção crônica com formação de cistos cerebrais. Portanto é limitado o trabalho com ratos apesar da obtenção de bons estudos sobre primo-infecção, e particularmente importante para o estudo e compreensão dos mecanismos de resistência e de indução da imunidade.

Assim é importante a utilização de outros modelos como o Hamster (*Mesocricetus auratus*), como modelo experimental na imunidade contra toxoplasma, (Freyre *et al.*, 2001, Freyre *et al* 2003 b).

O modelo proposto deve ser estudado exaustivamente para conhecer sua resposta frente a desafios com o agente. Verificar a transmissão congênita durante a etapa crônica da infecção pelo *T. gondii*. Demonstrar que a transmissão congênita durante a etapa aguda da infecção, seria muito freqüente e demonstrar se o modelo Hamster poderia infectar seus filhotes durante a fase lactogênica., para detectar se esta via de transmissão não seria mais freqüente que a transmissão congênita, que levaria a erros de interpretação de resultados. Só assim poderemos saber se o Hamster é um bom modelo experimental para o estudo da Toxoplasmose.

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com o laboratório de Toxoplasmosis de la Universidad de La República, Facultad de Veterinaria - Departamento de Parasitología Veterinaria-Montevideo, Uruguay, com o objetivo de estabelecer um novo modelo experimental para a toxoplasmose em Hamster (*Mesocricetus auratus*), através da análise da resposta imune desta espécie quando desafiado com o *T. gondii*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. Gerais**

Verificar a aplicabilidade do modelo hamster, no estudo da imunidade frente à toxoplasmose congênita.

### **2.2. Específicos**

**2.2.1.** Ensaia a transmissão congênita da toxoplasmose durante o estágio crônico da infecção.

**2.2.2** Ensaia a transmissão congênita de toxoplasmose durante o estágio agudo da infecção.

**2.2.3..** Verificar a transmissão lactogênica.



## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Definição

O *Toxoplasma gondii* é, como a maior parte dos Apicomplexa, um parasita coccídeo intracelular obrigatório (Dubremetz, 1999). Os hospedeiros definitivos são os felídeos, que podem ser chamados de hospedeiros completos, pois também podem ser hospedeiros intermediários, quando apresentam o ciclo extra-intestinal ou tecidual o qual ocorre em muitas outras espécies de vertebrados, incluindo o homem (Taboada & Merchant, 1997; Frenkel, 1997; Dubey, 1998b).

### 3.2 Histórico

A toxoplasmose é uma zoonose com distribuição cosmopolita, no entanto sua prevalência pode variar dentro de um mesmo país ou estado (Jamra 1964, Baruzzi 1970, Ferraroni e Marzochi 1980, Coutinho et al 1981, Guimarães et al 1992).

No ano de 1908, Nicolle e Manceaux, descreveram um parasito intracelular no baço e no fígado de um roedor do norte da África, o *Ctenodactylus gundi*. Acreditando pertencer ao gênero *Leishmania*, os cientistas o denominaram de *Leishmania gondii*.

No mesmo ano, no Brasil, Splendore, observou o mesmo parasito no coelho e também comparou-o ao agente da leishmaniose visceral. No ano seguinte, Nicolle e Manceaux retificaram sua posição anterior, sendo informado à Academia de Ciências de Paris que renomearam o parasito como *T. gondii* (Freyre, 1989; Pizzi, 1997).

Posteriormente, vários pesquisadores encontraram em diversos animais, parasitos morfológicamente semelhantes ao *Toxoplasma gondii*, que foram denominados de acordo com a espécie animal, (*T.canis*, *T.columbae*, *T.gallinarum*,

*T.cuniculi*). Porém, em 1939 Sabin chegou a conclusão que era uma única espécie de protozoário (Freyre, 1989; Pizzi, 1997).

### 3.3 Taxonomia

Segundo Levine *et al.* (1980) e Levine (1985), este parasita é classificado como:

Reino Protista, Haeckel, 1866  
 Sub-Reino *Protozoa*, Goldfuss, 1817  
 Filo Apicomplexa, Levine, 1970;  
 Classe *Sporozoea*, Leukart, 1879;  
 Subclasse *Coccidia*, Leukart, 1879;  
 Ordem *Eucoccidiida*, Léger and Duboseq, 1910;  
 Subordem *Eimeriina*, Léger, 1911.  
 Família *Sarcocystidae*, Poche 1911;  
 Sub família *Toxoplasmatinae*, Biocca, 1959  
 Gênero *Toxoplasma*, Nicolle e Manceaux, 1909

### 3.4 Morfologia

Esses parasitos são encontrados sob 3 formas evolutivas: taquizoítos, forma de multiplicação que ocorrem numa infecção aguda; bradizoítos, contidos no interior dos cistos ou forma de multiplicação lenta, nas infecções crônicas ou assintomáticas e oocistos nas fezes de felídeos, pois resultam do ciclo enteroepitelial do parasito, que só ocorre no intestino de membros da família Felidae (Acha e Szyfres, 1987; Kawazoe, 2000).

### 3.5 Ciclo Biológico

O ciclo biológico, deste protozoário, ocorre de duas maneiras: sexuado ou ciclo enteroepitelial e assexuado ou ciclo extra-intestinal. Estes dois diferentes padrões de multiplicação ocorrem em felídeos, após a infecção. O ciclo enteroepitelial ou intestinal de infecção ocorre apenas nestes hospedeiros definitivos (gatos e em outros felídeos), enquanto o ciclo extra-intestinal de infecção é o padrão

que ocorre em todas as espécies que servem de hospedeiros intermediários (Swango, Bankemper e Kong, 1992; Gagne, 2001).

### 3.6 Transmissão

A ingestão de carne ovina mal passada pode disseminar o *T. gondii* para os carnívoros, inclusive o homem (Coteeler e Famere, 1984). A contaminação dos ovinos ocorre através dos alimentos, pasto e ração contaminados com oocistos eliminados por felinos (Blewet e Watson, 1983).

São citadas ainda outras vias de transmissão, porém de menor importância na epidemiologia da toxoplasmose, como a transmissão através de sangue ou de componentes sanguíneos (Amato Neto *et al.*, 1963; Frenkel, 1974b,; Beouvais *et al.*, 1976; Wendel, 1994), do transplante de órgãos (Reynolds *et al.*, 1966; Rynning *et al.*, 1979; Rose *et al.*, 1983) e ainda as decorrentes de acidentes de laboratório (manuseio de animais infectados, vidrarias e seringas contaminadas), ou de necropsias de animais contaminados (Brown e Jacobs, 1956; Fisher e Reid, 1973; Herwaldt e Juranek; 1993).

Vetores como responsáveis por transmitir a doença foram temas de muitos estudos (Giovannoni *et al.*, 1952, Nussenzweig e Deane, 1958). Nenhum deles, no entanto, conseguiu demonstrar que a transmissão do parasito se dê através de picadas. Mas os artrópodes podem servir como possíveis carreadores mecânicos de oocistos, podendo, contaminar alimentos que serão consumidos pelo homem.

As chuvas e os ventos também seriam responsáveis como carreadores para outros locais (Paim e Queiroz, 1963).

A ingestão de alimentos, como vegetais e água contaminados com oocistos de *Toxoplasma gondii*, também é um importante mecanismo de transmissão (Kasper e Ware, 1985). Esse modo de infecção, possivelmente, é o responsável pela prevalência da infecção por *T. gondii* em indivíduos vegetarianos e em animais herbívoros (Rawal, 1959).

A ingestão de leite de vaca ou de cabra, de ovos de galinha, de patos e de outras espécies contaminadas com taquizoítos, pode ser considerada uma outra forma potencial de transmissão de *T. gondii*, embora o parasito seja raramente isolado destes produtos (Jacobs e Melton, 1966; Walls e Schultz, 1968; Saari e Raisanen, 1977; Pinto *et al.*, 1993). A transmissão durante a amamentação não foi

ainda comprovada em humanos (Sacks *et al.*, 1982, Goldfa 1993), embora haja referências na literatura da infecção humana através de leite materno (Bonametti *et al.*, 1997), e de leite de cabra não processado (Sacks, Roberto, Brooks, 1982), já tendo sido detectado o parasito no leite de alguns mamíferos (Eichennwald, 1948; Chamberlain *et al.*, 1953). Está descrito que o leite não pasteurizado pode ser veículo de transmissão do protozoário, uma vez que a pasteurização destrói os taquizoítos. (Riemann *et al*, 1977).

### **3.7 Sinais Clínicos**

#### **3.7.1 Humanos**

Na medicina humana, Castellani em 1913 descreveu um caso de toxoplasmose em um menino, apresentando febre e esplenomegalia (Pizzi, 1997).

Em Praga, na Tchecoslováquia, em 1923, um médico oftalmologista chamado Janku descreveu pela primeira vez um protozoário com morfologia idêntica ao *T.gondii*, em cortes histológicos de olho de uma criança com o quadro clínico de hidrocefalia, microftalmia e coloma. Após cinco anos, Levaditis relacionou a hidrocefalia com a toxoplasmose congênita (Pizzi, 1997). Torres em 1927, no Rio de Janeiro, observou microorganismos compatíveis com o *Toxoplasma gondii*, em cortes histológicos de cérebro e músculo esquelético de uma criança, sugerindo ter ocorrido infecção congênita.

A comprovação quanto ao fato do *T. gondii* ser capaz de infectar o feto no útero foi constatado em 1937 por Wolf e Cowen pelo relato da ocorrência de toxoplasmose fetal cursando com encefalite, meningite e mielite, em recém-nascidos (Neto e Marchi, 1999).

A infecção congênita ocorre somente quando a mulher, não imune, é infectada durante a gravidez e a severidade da doença, depende do período gestacional que ela se encontra e da capacidade dos anticorpos maternos em proteger o feto (Chemello, Eckert e Teixeira, 1998; Dubey, 1998b). Normalmente uma mãe não gera mais do que uma criança com toxoplasmose congênita.

O risco de infecção dos fetos, nestes casos, é de 1-2 a cada 1000 no Chile (Muñoz, 1995), entre 2 e 4 a cada 1000 em Montevideo, Uruguai (Freyre *et al.*,

1993), de 0,33 a cada 1000 no Rio Grande do Sul- Brasil (Neto *et al.*, 2000), e de 1 a cada 1.000 crianças nascidas vivas na Argentina (Hirt, 2001),

Um estudo sorológico com mais de 800 mães que tiveram filhos com esse tipo de infecção mostrou que não houve nenhum irmão com toxoplasmose congênita, com exceção de 14 pares de gêmeos (Renold *et al.*, 1992 apud Guimarães *et al.* 1992). A ocorrência de transmissão transplacentária na mulher, ocorre quando ela contrai a primo-infecção durante a gestação, (Glaser *et al.* 1994). No primeiro trimestre, a incidência da infecção é baixa, mas as lesões fetais são graves. Estima-se que 17% dos fetos serão infectados e 80% destes irão sofrer doença severa. As infecções no segundo trimestre resultam em 25% de fetos infectados e destes, 30% terão doença severa. Quando a primo-infecção materna ocorre no último trimestre a incidência de infecção fetal é de cerca de 70% ou mais e as lesões são menos severas (Camargo, 1996; Acha e Szyfres, 1987). No primeiro trimestre de gestação, se a infecção ocorre no processo de nidação, podem ocorrer endometrites e aborto entre 6 a 8 semanas. Se a infecção ocorre na etapa de formação da placenta, pode ocorrer placentite e aborto entre o terceiro e quarto mês, e se a gestação tiver continuidade, nascem com tantos danos que são incompatíveis com a vida. A infecção, ocorrendo no segundo trimestre da gestação, as crianças nascem com a Tétrade de Sabin: macro ou microcefalia, retinocoroidite bilateral, calcificações cerebrais e retardo mental. A gestação estando no terceiro trimestre, a infecção por *T. gondii*, causa leve déficit intelectual, retinocoroidite bilateral com ou sem estrabismo ou nascimento de crianças aparentemente normais, que apresentam cistos em estado de latência (Pizzi, 1997).

A toxoplasmose pós-natal, não é tão grave, a não ser se ocorrer uma baixa de imunidade, em geral só 10 a 20% de indivíduos imunocompetentes infectados após o nascimento apresentam sintomas semelhantes a uma gripe, (Morris, 1996; Chemello, Eckert e Teixeira, 1998). A toxoplasmose vem apresentando um quadro grave em indivíduos com o sistema imune severamente comprometido, causando principalmente encefalite e retinite. Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) iniciaram-se associações desta patologia com o oportunista *T. gondii*. Também, fazem parte do grupo de risco receptores de órgãos e pessoas em tratamento quimioterápico (Pizzi, 1997; Kawazoe, 2000).

Estima-se, que 30 a 40% dos adultos, nos EUA possuem anticorpos para *T. gondii*. (Dubey, 1994). Inquéritos sorológicos realizados em diversos países indicam

uma infecção de 40 a 50% em humanos adultos saudáveis entre 30 a 40 anos de idade. A variabilidade de frequência da infecção está ligada a diversos fatores, tais como padrões culturais da população, seus hábitos alimentares, a idade, e a procedência (rural ou urbana), (Apt *et al.*, 1973; Amendoeira, 1980; Melamed 1991). A idade tem sido associada, com alta frequência de infecção pelo *T.gondii* (Jamra, 1964; Remington, 1974; Ricciardi, 1976; Melamed *et al.*, 1981) pois com o aumento da faixa etária aumentam também as chances do indivíduo entrar em contato com algum dos diversos mecanismos de transmissão (Apt *et al.*, 1973; Osório *et al.*, 1977). Dados, esses, que variam de acordo com fatores geográficos e climáticos, hábitos alimentares, tipo de trabalho, higiene do meio ambiente e presença de gatos infectados (Ulon, 1996).

### 3.7.2 Animais

Animais domésticos têm sido apontados como fonte de infecção para o homem (Jacobs e Melton 1966; Lindsay *et al.*, 1997). No entanto outros autores (Kimball *et al.* 1960; Magaldi *et al.* 1969; Jamra *et al.* 1969; APT *et al.* 1973; Fisher e Reid 1973; Camargo, 1995) estudando diversos animais naturalmente infectados, observaram que o contato só tem importância epidemiológica quando é associado ao hábito de ingerir carne mal cozida. A presença de gatos, no entanto, parece ser relevante, uma vez que este animal tem comprovada importância na manutenção do ciclo (Hutchison, 1965; Apt *et al.*, 1973; Dubey, Miller e Frenkel, 1970). Hutchison (1967), foi o primeiro a demonstrar que os felinos domésticos podiam eliminar *T.gondii* pelas fezes; postulou também que os parasitos estariam contidos em ovos de ascarídeos do gênero *Toxocara*, porém sua infectividade só foi relacionada com um pequeno oocisto coccidiano por Frenkel, Dubey; Miller, (1970).

O ciclo selvático do parasito foi descrito em 1975 e 1976 (Pizzi, 1997). Incluiu-se entre os felídeos selvagens, o leão da montanha (*Felis concolor*), jaguar (*Felis yagouaroundi*), tigre de bengala (*Felis bengalensis*), e o ocelote (*Felis pardalis*), (Dubey, 1987).

Melo (1910), citou a toxoplasmose em cães em Turin na Itália (Dubey *et al.*, 1988) e em 1942, Ollafson e Manlux. em ovinos, nos Estados Unidos (Ulon, 1996). O diagnóstico de toxoplasmose suína naturalmente adquirida nos Estados Unidos já

descrita por Farrel et al., (1952); e, em 1956, Feldman e Miller observaram as primeiras evidências de infecção em caprinos num rebanho no estado de Nova York.

Weinman e Chandler (1956), revelaram em suas pesquisas uma forte evidência de que os suínos albergariam na carne protozoários até o momento do cozimento, posteriormente confirmado por Jacobs, Remington, Melton, (1960), que elucidaram o significado epidemiológico da forma cística do *T. gondii*, comprovando a importância das carnes de animais serem bem cozidas, pois podem agir como fonte de infecção se ingeridas mal cozidas pelos seres humanos. Segundo (Dubey et al, 1988) o consumo de carne de suíno é uma das maiores causas de contaminação para os seres humanos, tendo em vista que os cistos nos suínos persistem por dois anos, e que existe um cisto por cada 50 gramas em uma carne de porco mal cozida, e que seria a forma mais frequente de infectar o homem, (Dubey, 1986).

A toxoplasmose atinge também várias espécies animais. Nos cães provoca principalmente alterações musculares, respiratórias e gastrintestinais. Em outras espécies, que são importantes na transmissão via carne para humanos, que são suínos, seguidos de caprinos e ovinos, ocorrem alterações importantes (Dubey, 1999).

Nos suínos a infecção pós-natal é mais freqüente que a transplacentária, ocorrendo doença clínica em neonatos e leitões jovens, mas também ocorrem abortos e natimortos em rebanho suínos (Dubey e Beattie, 1988; Blood e Radostitis, 1991; Freyre et al., 1991).

Em ovinos a toxoplasmose pode causar abortos, natimortos e mortalidade neonatal. Também pode ocorrer reabsorção embrionária e assim proprietários acabam considerando essas fêmeas, como sendo estéreis (Dubey e Towle, 1986; Freyre e Fálcon, 1989). A patologia é semelhante ao que ocorre nas mulheres e também ocorre a proteção na prenhes subsequente (Innes, 1997).

Os bovinos são uma das mais resistentes espécies ao *T. gondii*, sendo inclusive descrito que não necessariamente ocorre persistência dos cistos pela vida toda do hospedeiro, como ocorre em ovinos e humanos (Innes, 1997).

Ocorre alta prevalência da infecção por *T.gondii* tanto em animais silvestres, naturalmente infectados, quanto nos domésticos (Sogorb et al., 1972, Ferraroni e Marzochi, 1980).

### 3.8 Imunologia e Patogenicidade

A resposta imunológica dos hospedeiros ao *T. gondii* é complexa e faz com que o hospedeiro imunocompetente desenvolva imunidade por toda sua vida, ficando resistente a novas infecções. (Denkers, Caspar e Sher, 1994).

O mecanismo responsável pela Imunidade protetora ocorre pelos mecanismos humorais e celulares (Chemello, Eckert e Teixeira, 1998). No sistema imune, o parasito é barrado pelos monócitos e macrófagos auxiliados pelos anticorpos específicos da classe IgM e IgA. Quando o IgM é detectado em virtude da sensibilidade da técnica de Elisa é necessária a dosagem sorológica de IgA, que quando reagente representaria uma infecção num período inferior a oito semanas. O diagnóstico poderia ser complementado pela determinação dos índices de avidéz de IgG que, em níveis baixos (inferior a 30%), significaria infecção aguda, num período inferior a quatro meses, níveis altos, (superior a 60%) representariam infecção antiga. Na fase aguda da infecção é produzido IgM e IgA, seguida da produção de IgG. Nas formas crônicas na maioria das infecções o agente não causa conseqüências clínicas aparentes (Grunspan, 1996, Dubey, 1998b), pois os taquizoítos poderiam persistir por muito tempo no cordão espinhal e cerebral e também podendo persistir na placenta meses após o início da infecção na fêmea segundo esses autores. O aumento nos títulos de IgM é geralmente de curta duração, positivando a partir da primeira semana pós-infecção e alcançando a concentração máxima em um mês. As IgG podem persistir com títulos elevados por um longo tempo, sendo detectado em 12-14 dias e alcançando um pico máximo em 2-3 meses (Camargo, 1995; Pizzi, 1997; Chemello, Eckert e Teixeira, 1998; Kawazoe, 2000).

O parasito é capaz de colonizar todos os órgãos, tendo predileção pelo sistema nervoso, principalmente na fase crônica da infecção, onde ocorre neste sistema e coriorretina. Após a resposta imunomediada por células e liberação do IFN- $\gamma$ , ocorre a presença prolongada o parasito nos tecidos do hospedeiro, o que pode induzir uma estimulação da hipersensibilidade retardada (Pizzi, 1997; Kawazoe, 2000).

Algumas situações como, cepas de maior virulência, uma dose infectante abundante, uma via de penetração favorável, e um hospedeiro não imunocompetente, pode levar a conseqüências de uma toxoplasmose severa e até



fatal (Freyre, 1989), assim como em pacientes com câncer, transplantados, e com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Alexandre e Hunter, 1998).

Dubey *et al.* (1997), estudaram a distribuição dos cistos inoculando 10 fêmeas adultas Sprague-Dawley com: 1 oocisto (3 ratas: grupo A),  $10^5$  oocistos (3 ratas: grupo B) da cepa VEG ou  $10^4$  oocistos da cepa GT-1 (4 ratas: grupo C). Todos os grupos de ratas foram sacrificados com 76, 240 e 443 dias pós-inoculação, respectivamente. Foram encontrados cistos no cérebro das 10 ratas, por microscopia direta. Nos outros órgãos foi realizada digestão péptica e bioensaiados em camundongos, sendo encontrados cistos em 3 tecidos extra-neurais das ratas do grupo A, 6 do grupo B e 10 do grupo C. Freyre *et al.* (2003b) inocularam ratas Wistar com  $10^1$  e  $10^4$  oocistos e procuraram cistos cerebrais por microscopia. Com os cérebros negativos foi realizado bioensaio em camundongos. Foram encontraram 83% de positivos para cistos cerebrais, seja por visualização microscópica ou por uso de aglutinação direta do soro dos camundongos. Um experimento semelhante havia sido realizado por Freyre *et al.* (2001b) também em ratas Wistar, onde foram encontrados 78,6% de soros de camundongos positivos pela aglutinação direta, após o bioensaio de cérebros.

De acordo com Dubey (1987), a idade, sexo e a espécie do hospedeiro influenciam na suscetibilidade ao *T. gondii*.

Existem três linhagens principais do *T. gondii* relacionadas com virulência: a Tipo 1 está associada com virulência aguda em camundongos; a 2 induz patologia crônica em linhagens suscetíveis de camundongos e a 3 é a menos virulenta. Nos humanos a linhagem Tipo 1 está freqüentemente associada com infecção congênita enquanto o Tipo 2 é mais comum em pacientes em que a doença foi reativada. Outro fator é que os oocistos produzem infecção mais virulenta que os cistos (Alexander e Hunter, 1998).

A vacina deveria ser uma boa prevenção e com um custo menor que o observado hoje, com exames e tratamento de doentes. Ela possui, o objetivo de reduzir o risco fatal, reduzir o número de cistos deste parasito nos animais e prevenir a formação de oocistos em felídeos. (Dubey, 1994). A vacinação de animais tem um outro objetivo importante, que é o de minimizar as perdas econômicas por abortos (Dubey, Lindsay e Speer 1998). Segundo Galisteo (2004), a vacina ideal para toxoplasmose deve prevenir a infecção humana, e os alvos vacinais deverão ser os felinos, que são os responsáveis pela disseminação ambiental de oocistos.

### 3.9 Diagnóstico

A pesquisa direta de taquizoítos do *T. gondii* pode ser feita na fase aguda, a partir de vários componentes orgânicos, como, sangue, exsudato, leite, líquido cefalorraquidiano, saliva, escarro, medula óssea, cortes de placenta, além de conteúdos de infiltrados cutâneos, ou biópsia de baço, fígado, músculos e gânglios linfáticos (Neto e Marchi, 1999; Kawazoe, 2000). Na grande maioria das vezes o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é feito pela identificação e quantificação de anticorpos específicos através de sorologia (Camargo, 1996).

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose em gestantes, recém-nascidos, e demais indivíduos deve ser corretamente interpretado para diferenciar infecção de doença. Se a intenção é avaliar a imunidade do paciente, os testes sorológicos que detectam anticorpos da classe IgG são suficientes (Camargo, 1996). A duplicação do título de IgG aglutinantes num período de 2 a 4 semanas ou um título elevado de IgM específica, indica uma infecção aguda. Uma infecção aguda por *T. gondii* unicamente significa que o microorganismo está multiplicando-se rapidamente, fenômeno que pode estar ou não acompanhado de sinais clínicos (Camargo, 1996).

No recém-nascido, anticorpos da classe IgG específicos, podem ser anticorpos maternos de transferência passiva, que na criança não infectada, desaparecem progressivamente até a negatificação ao longo do primeiro ano de vida (Camargo, 1996). A pesquisa de IgM e IgA em recém-nascidos é utilizada para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, pois não atravessam a placenta e quando presente no soro indicam a produção pelo próprio feto, em resposta a uma infecção pelo *T. gondii* (Kawazoe, 2000).

### 3.10 Profilaxia

Como prevenção as mulheres grávidas, não devem manter contato direto com gatos, solo ou ingerir carne mal passada (Dubey, 1998b). O acompanhamento sorológico da toxoplasmose em mulheres grávidas, e seu tratamento quando detectada a infecção aguda, é feito em poucos países devido ao custo. Esse procedimento é muito importante, mas na verdade é mais paliativo que preventivo, já que o feto pode ser infectado antes de instalado o tratamento, vindo a nascer, já com

graves danos, ou até sem seqüelas, mas portadores de cistos (Freyre, 2006 Comunicação Pessoal).

Se a mulher possui anticorpos antes de ficar grávida ela é imune e o feto está protegido da infecção, não sendo, necessários métodos preventivos tão rigorosos (Frenkel, 1982; Camargo, 1996).

A vacinação, deverá ser uma boa prevenção, por um custo menor que o observado hoje, com exames e tratamento de doentes. Ela possui, o objetivo de reduzir o risco fatal, reduzir o número de cistos deste parasito nos animais e prevenir a formação de oocistos em felídeos, (Dubey, 1994), além de minimizar as perdas econômicas por abortos (Dubey, Lindsay & Speer 1998). Segundo Galisteo (2004), a vacina ideal para toxoplasmose deve prevenir a infecção humana, e os alvos vacinas deverão ser os felinos, que são os responsáveis pela disseminação ambiental de oocistos.

Não existem atualmente vacinas aplicáveis às pessoas (Nielsen *et al.*, 2000). Uma vacina foi testada, com alto nível de proteção contra a emissão de oocistos toxoplásmicos pelos gatos. O uso dessa vacina ajudaria a diminuir a prevalência da infecção toxoplásmica humana e talvez também a dos animais de consumo (Choromanski *et al.*, 1994; Frenkel *et al.*, 1991; Freyre *et al.*, 1993). Tratando-se de uma vacina para *Toxoplasma* vivo, não foi possível ser elaborada e distribuída em condições rentáveis. Existe também uma vacina que ajuda a diminuir as perdas por aborto ovino toxoplásmico, porém sua eficácia é de 70%, e não impede a colonização fetal por *Toxoplasma*, de modo que o consumo de carne aqui produzida continua sendo fonte de infecção para as pessoas (Freyre, 1998).

### **3.11 Modelos experimentais para o estudo de Toxoplasmose**

Vários modelos experimentais já foram testados para se estudar o comportamento do agente, suas formas de contaminação e formas de transmissão, O modelo rato tem sido extensivamente usado para o estudo da transmissão congênita e da imunidade contra a toxoplasmose (Dubey e Shen, 1991; Zenner *et al.*, 1993; Paulino e Vitor, 1999; Freyre *et al.*, 1999a; Freyre *et al.*, 2003a; Freyre *et al.*, 2003b; Freyre *et al.*, 2006a; Freyre *et al.*, 2006c). As linhagens de ratas empregadas aos modelos referidos: Wistar, Long Evans, Fischer e Sprague-Dowley têm mostrado muitas variações individuais em sua resistência natural a

toxoplasmose. Foi observado que não é possível ensaiar no modelo rato, um imunógeno em uma linhagem suscetível à toxoplasmose, pois as linhagens disponíveis mostram considerável resistência natural a esta infecção e podem tolerar inoculações elevadas de várias cepas. O trabalho com ratas, apesar da obtenção de bons estudos sobre primo-infecção e particularmente importante para o estudo e compreensão dos mecanismos de resistência e de indução da imunidade variam muito, são animais maiores e por isso requerem, maiores quantidades de imunógenos (Freyre et al., 2001).

Estudos comparando técnicas de bioensaios, histopatológicas e PCR, demonstraram que o bioensaio é mais eficiente como forma de testar a virulência do agente (Garcia, 2006). O objetivo de estudar a infecção por *T. gondii* usando modelos experimentais é obter um melhor entendimento da doença em humanos (Innes, 1997).

Entre os animais de experimentação os ratos são considerados importantes na epidemiologia da toxoplasmose porque eles seriam fontes importantes de infecção para porcos e possivelmente para gatos (Dubey , 1997).

Dubey em 1991 não obteve transmissão congênita durante o período crônico da infecção em ratas inoculadas algumas semanas antes da gestação.(Dubey e Shen, 1991). Pesquisando a fase aguda da doença, Zenner *et al.* (1993), observaram uma incidência de 58,2%, 35,2% e 62,8% em ratas infectadas durante a prenhes, pelas cepas RH, 76K e Prugniaud, respectivamente.

Em 1997, Dubey constatou que a infecção de ratas não imunes ao *T. gondii*, durante a gestação foi transmitida a pelo menos um terço da ninhada. Em 1999, Paulino e Vitor observaram que filhotes de ratas imunizadas antes da gestação ficaram totalmente protegidos contra desafios efetuados durante a gestação os mesmos autores em outro trabalho usaram diferentes linhagens de ratas Wistar e Holtzn e duas cepas de *T. gondii*, variando as formas de inoculação, (subcutânea e oral), e concentrações do inóculo, o resultado foi que 2,9% dos recém nascidos nos quais as mães foram cronicamente infectadas estavam infectados com o *T. gondii*.

Freyre em 1999 obteve 10% de transmissão transplacentar em ratas onde foram desafiadas com diferentes cepas do agente antes da concepção.

Freyre (2001), pode concluir que o grau de transmissão durante a gestação de ratas pode variar de 0-90%, e isto ele atribui a suscetibilidade genética das ratas pois elas receberam quantidades similares do inóculo de cepas variadas de

*Toxoplasma gondii*. O mesmo autor no ano de 2003b usando o modelo rata obteve 51% de transmissão transplacentária com uma variação de (10 a 80%), não havendo diferenças quando o inóculo ser cisto ou oocisto. O modelo rato foi testado para se detectar a imunidade com cepas cruzadas, e o resultado não foi promissor quando não usadas as mesmas cepas para imunizar e desafiar. (Freyre *et al* 2006c). Isto sem contar que altas doses devem ser usadas, e talvez a via de inoculação intra - peritoneal não tenha sido favorável para a formação da imunidade (Freyre *et al*, 2006c).

Entre os modelos testados, o camundongo (Balb/C e CF1), é o mais utilizado, devido a seu pequeno tamanho, fácil manuseio, doses para inoculação menores e são animais com facilidade para se reproduzirem. Como modelo experimental vacinal de *T. gondii*, ele é um forte candidato, pois os camundongos Balb/c têm comportamento similares aos humanos quando infectados no início da gestação, e quando infectados cronicamente através de inoculações subcutâneas de cepas com PBS e 12 dias após desafiadas com as cepas via peritoneal, (Roberts *et al*, 1994).

Em 1992 foi demonstrado que a infecção congênita em fêmeas de camundongos Balb/c foi capaz de proteger suas ninhadas durante a gestação, os resultados, neste caso, demonstraram que o camundongo fêmea Balb/C pode ser usado como modelo experimental para testes vacinais importantes aos humanos e ovinos. A infecção no começo da gestação causa morte fetal, reabsorção ou aborto. A mortalidade diminui quando as mães são infectadas mais para o final da gestação. Todavia, os Balb/C quando infectados semanas após colocadas em cria, desenvolvem uma imunidade capaz de proteger totalmente seus embriões, mesmo se a re-infecção ocorrer durante prenhez, (Roberts e Alexander, 1992).

Freyre (2006b), comparando métodos diagnósticos para prenhez e infecção congênita em camundongos Balb/C demonstrou resultados promissores pois ao serem imunizados 45 dias antes de cruzarem com a cepa Prugniaud de *T.gondii* na dose de  $10^4$  por via oral e outro grupo foi desafiado doze dias após a concepção com doses via oral das cepas Prugniaud (Bradizoítos) na dose de  $10^3$ , ou  $10^2$  e  $10^3$  de bradizoítos das cepas M3 e M7741 também via oral. No primeiro grupo os resultados foram promissores pois após o nascimento os filhotes eram bioensaiados e realizada aglutinação direta demonstrando que a transmissão congênita ocorreu em 2 de 10 camundongos inoculadas. No segundo experimento em que foram

desafiadas enquanto grávidas para demonstrar que houve infecção aguda com a cepa Prugniaud, 4 ninhadas foram positivas na prova de AD, com a cepa M3 na dose de  $10^2$ , 4 de 10 ninhadas foram positivas na prova de AD do bioensaio, e com a mesma cepa na dose  $10^3$ , 6 de 10 foram positivas. Quando desafiadas com a cepa M7741 na dose de  $10^2$ , o resultado a prova de AD foi de 4 positivos em 10 ninhadas, e quando a dose se elevou para  $10^3$ , somente 3 de 8 foram positivos.

Existem poucos antecedentes de toxoplasmose congênita experimental em hamsters, No modelo de toxoplasmose congênita experimental em hamsters, realizado por De Roever-Bonnet, em 1960, (Freyre, 2006 comunicação pessoal) foi comprovada transmissão congênita de toxoplasmose durante a fase crônica da infecção, mas não se sabe a proporção desta transmissão, porque os resultados se expressaram em conjunto com a transmissão constatada em camundongos. Freyre e colaboradores, verificaram que a transmissão da cepa Prugniaud se produziu em 20% de 10 hamsters portadores de infecção crônica, durante a primeira gestação posterior a inoculação, e em 0% durante a gestação subsequente (Freyre, 2006 comunicação pessoal). No Modelo Hamster realizado por Frenkel, Freyre e Smith (1986), consistiu em proteção limitada do mutante ts4 de *T.gondii* contra desafios provocados durante a gestação de hamsters. Neste caso o autor declara que a dose de desafio utilizada foi desproporcional em relação ao peso corporal.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção de oocistos de *Toxoplasma***

Para a obtenção de oocistos do parasito, foram utilizados gatinhos recentemente desmamados, negativos na AD para toxoplasmose na diluição 1:64. Foi administrado à eles o cérebro de rato com infecção toxoplásmica crônica. Foi realizada a coleta das fezes dos dias 4 a 7 pós-infecção, as quais foram concentradas pelo método de Sheather Modificado, e foram incubadas com agitação em 2% de ácido sulfúrico durante 96 horas até completarem a esporulação. Essa etapa de obtenção dos oocistos foi feita na Faculdade de Veterinária de Montevideo.

### **4.2 Medidas para a proteção biológica das pessoas envolvidas no projeto de trabalho.**

Foram aplicadas rigorosamente as diretrizes da Organização Mundial da Saúde para salvaguardar as pessoas envolvidas no presente projeto de trabalho, contra o risco de infecção toxoplásmica (Organización Mundial de la Salud, informe de um comitê de expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 1994).

### **4.3 Cepas de *Toxoplasma***

Foi empregada para imunizar, a cepa ME-49 por via oral, que é uma cepa completa (formadora de cistos e oocistos). Esta característica se considera importante para que intervenham na imunização mais antígenos. Muitas outras cepas poderiam cumprir este papel, além da cepa mencionada, simplesmente se elegeu uma delas.

Foi utilizada para desafiar, a cepa Prugniaud . A via de inoculação foi oral, pois deve imitar a rota de infecção natural. Esta cepa foi utilizada, porque têm sido ensaiada para a transmissão congênita em ratas (Zenner *et al.*, 1993; Freyre *et al.*, 2001; Freyre *et al.*, 2003;).

#### **4.4 Método para detectar gestação:**

Para detectar a gestação em fêmeas de hamsters, foram alojadas 4 fêmeas para cada macho (figura 5 ), Iniciamos a pesá-las sete dias mais tarde (figuras 16 e 16.1). As fêmeas que apresentaram um aumento de peso corporal de 5 gramas ou mais foram consideradas prenhes.

#### **4.5 Bioensaio**

O bioensaio em camundongos das linhagens CF1 foi descrito por (Freyre *et.al.*, 2001). Os Camundongos foram adquiridos do Laboratório Central do Estado (Lacen). Todos eram fêmeas e com 3-4 semanas de idade. Foi feito um pool dos órgãos dos Hamsters recém nascidos (pulmão e fígado) após a eutanásia (figuras 12 e 12.1). Após eram homogeinizados em NaCl 0,5% com 1000 UI de penicilina e 0,1 mg de streptomina por ml de homogeinzado, e inoculado imediatamente intraperitonealmente em 4 camundongos. Nas ninhadas de oito ou mais filhotes, se utilizou a metade dos filhotes. Nas ninhadas com menos de 8 recém nascidos, todos os filhotes foram utilizados. Após vinte e cinco dias estes camundongos foi retirado sangue (figura 14) e seus soros examinados para detectar anticorpos específicos através da reação de (AD) Aglutinação Direta, Se considerou que os filhotes estavam protegidos, quando as sub-inoculações em tecidos de recém nascidos resultaram negativas para *T.gondii*.



## 5 EXPERIMENTOS

### 5.1 Experimento No. 1: Transmissão congênita durante a etapa crônica da toxoplasmose.

Este experimento foi realizado para verificar a hipótese de que a transmissão congênita da toxoplasmose durante sua etapa crônica, é nula ou mínima em animais (hamsters) resistentes. Para a validade deste modelo esta transmissão não deveria ocorrer. Seria tolerável que ocorresse com baixa frequência. Esta condição permitiria imunizar com *T.gondii* viável nas fêmeas antes da gestação, e confirmar que a própria imunização não resultará em fonte de infecção durante a gestação posterior. O presente experimento objetiva ensaiar a transmissão congênita da toxoplasmose durante sua etapa crônica em hamsters gestantes.

Utilizou-se dez hamsters fêmeas, todas vindas de um criatório de Santo Antônio da Patrulha, com idades de 2 meses, aptas à reprodução, em média pesando 100 gramas de peso vivo. Todas as fêmeas foram testadas por HAI (figura 1), antes de iniciado os experimentos. O experimento foi realizado no biotério do laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (figura 2).

As dez hamsters receberam 40 oocistos esporulados da cepa ME-49 de *T.gondii* por via oral, através da cânula feita especialmente para a espécie tendo em vista que estes animais possui bolsas que poderiam armazenar o inóculo e este não ser ingerido.(figura 3) Após 60 dias foram colocadas com machos (figuras 4 e 5). As crias que nasceram, foram eutanasiadas e homogenizadas com solução NaCl 9% (figuras 7,8,9 e 10), e sub-inoculadas intra-peritonealmente em 4 camundongos (figura 13). Vinte e cinco dias mais tarde estes camundongos foram anestesiados e foi feita coleta de sangue (figura 14), para realização da reação de aglutinação direta (AD) para *T.gondii*. segundo Desmonts e Remington (1980),

O sangue foi retirado da cavidade orbital do olho com um tubo de microematócrito e coletado em tubos de ensaio, posteriormente centrifugado e seu soro analisado. (figura 15).

Logo depois deste primeiro parto, as fêmeas seriam postas a copular novamente, repetindo-se o resto do desenho, se apresentassem algum título. Como todas foram negativas não foram postas para cruzarem novamente.

**Índice de avaliação:** O sucesso deste experimento será dado por uma taxa de transmissão congênita de *Toxoplasma* menor de 20% durante a primeira gestação, e ausência de transmissão na gestação subsequente.

## **5.2 Experimento No. 2: Transmissão congênita e lactogênica durante a etapa aguda da toxoplasmose.**

Este experimento foi realizado para verificar a hipótese de que, a transmissão congênita da toxoplasmose durante sua etapa aguda, é muito freqüente. Para a validade deste modelo, esta transmissão deveria ocorrer em pelo menos 80% das oportunidades. Esta condição permitiria efetuar desafios válidos em fêmeas gestantes imunizadas, assim como constituir grupos controles de fêmeas gestantes não imunizadas, na qual a transmissão congênita deverá se verificar. Ao mesmo tempo é necessário determinar se existe transmissão lactogênica de *T.gondii* e se eventualmente esta via de transmissão não é mais freqüente que a transmissão congênita, o que poderia causar erros de interpretação dos resultados.

Foram ensaiadas as transmissões congênita e lactogênica da toxoplasmose durante sua etapa aguda, em hamsters.

Vinte hamsters fêmeas foram alojadas com machos em proporção 4:1. (figura 5) A partir do sétimo dia elas foram pesadas. (figuras 16 e 16.1), quando se verificava o aumento de peso superior a 5 gramas, a fêmea era considerada prenhe (Método de incremento do peso, descrito por Tarabla, 2000).

Os filhotes recém nascidos (figuras 7 e 8) da fêmea foram eutanasiados, bioensaiados em camundongos e 25 dias depois foi retirado sangue e seus soros foram testados pela técnica de (AD) aglutinação direta.

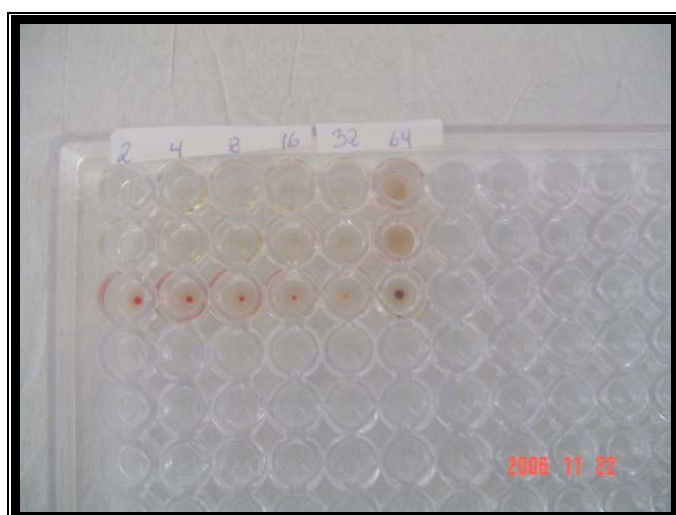
Os filhotes adotados, vindos de mães livres mamaram três dias nas hamsters inoculadas e após foram eutanasiados, e seus órgãos (pulmões e fígados) homogeinizados e bioensaiados em camundongos CF 1 (figuras 11,11.1 e 11.2).

Vinte cinco dias após os camundongos foram eutanasiados e foi coletado sangue e realizada a técnica de AD (aglutinação direta) para toxoplasmose.

Todas fêmeas foram eutanasiadas, 25 dias após terem sido inoculadas com *T.gondii* e também foi realizado a Técnica de AD nos seus soros.

**Índice de avaliação:** O sucesso deste experimento será dado pela transmissão congênita da cepa Prugniaud em pelo menos 80% das fêmeas estudadas, e pela ausência de transmissão lactogênica naquelas hamsters que não tenham realizado transmissão congênita.

Foram inoculadas 7 fêmeas de hamsters, com 10<sup>2</sup> das quais três adotaram filhotes de mães livres.



*T.gondii*

**Figura 1.** Placa de HAI, para



**Figura 2.** Local do experimento. (Local climatizado).



**Figura 3.** Cãnula para inoculação via oral.



**Figura 4.**Diferenças morfológicas entre macho e fêmea .



**Figura 5.** Casal de hamsters



**Figura 6.** Casal copulando.



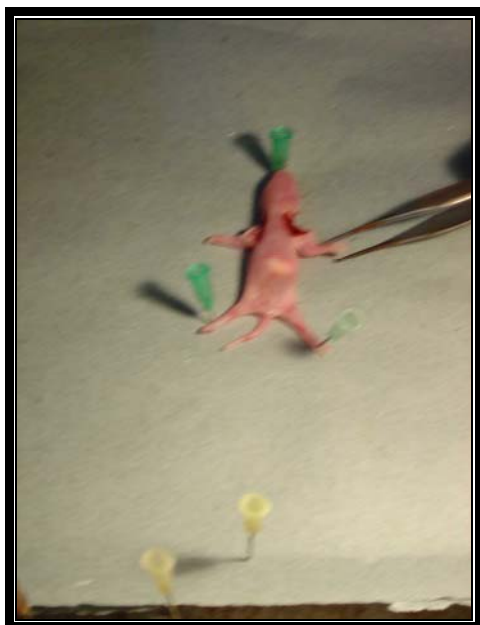
**Figura 7.** Fêmea de hamster com ninhada



**Figura 8.** Filhotes de hamsters recém nascidos.



**Figura 9.** Filhote de recém nascido.



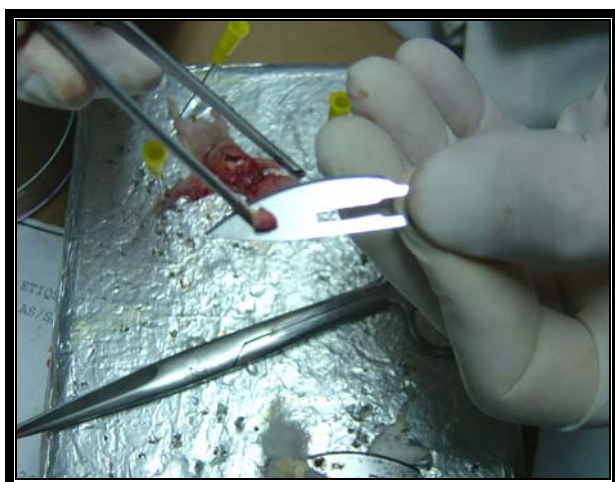
**Figura 10.** Preparação para retirada de órgãos



**Figura 11.** Retirando pulmões

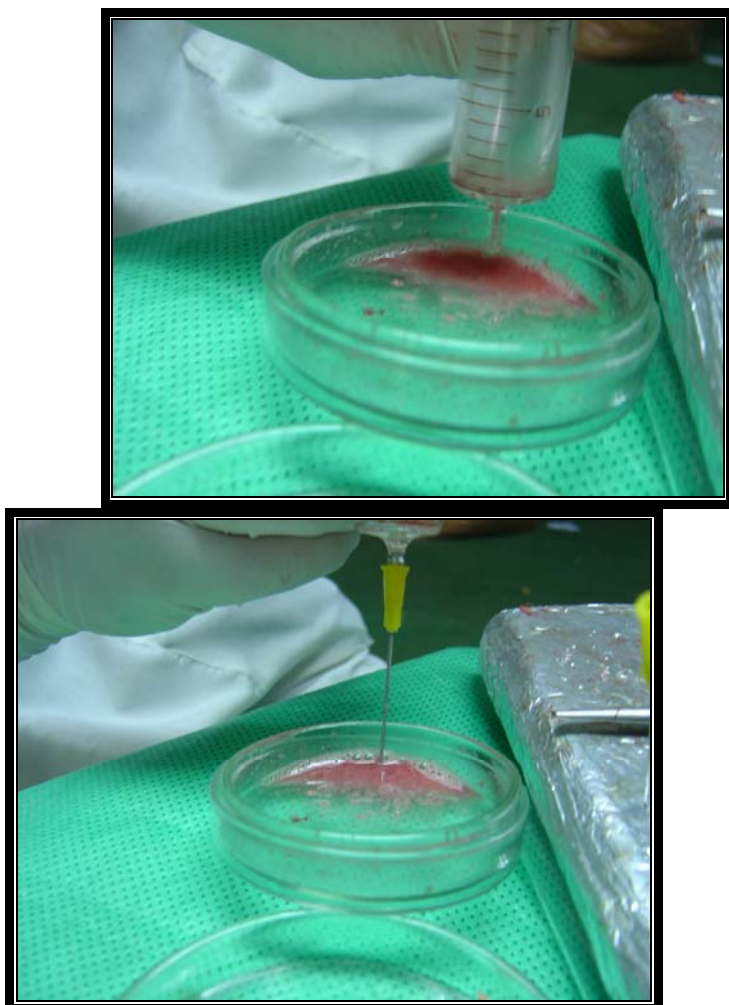


**Figura 11.1.** Sequência da retirada pulmões



**Figura 11.2.** Separando órgão.





**Figura 12 e 12.1.** Preparando o inóculo para ser bioensaiado em camundongos CF1



**Figura 13.** inoculando IP (Bioensaio)



**Figura 14.** Retirando sangue.



**Figura 15.** Armazenando sangue



**Figuras 16 e 16.1.** Pesagem de Hamster em balança de precisão



**Figura 17.** Administrando inóculo via oral para as Hamsters



Hamster

**Figura 18.** Retirando sangue

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resultados do Experimento 1

Todos os filhotes, das fêmeas de hamsters inoculadas com 40 oocistos via oral da cepa ME-49 e que 60 dias após foram postas para procriarem, apresentaram-se negativos na sorologia de Aglutinação Direta. Isto demonstra que a infecção é crônica as fêmeas não infectariam seus filhotes durante a gestação.

**Tabela 1: Aglutinação direta dos soros de fêmeas Inoculadas via oral com 40 oocistos da cepa ME49 de *T. gondii*, 60 dias antes de serem alojadas com os machos.**

<b>FEMEA HAMSTER</b>	<b>AGLUTINAÇÃO DIRETA</b>
<b>HAMSTER 01</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 02</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 03</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 04</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 05</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 06</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 07</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 08</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 09</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>HAMSTER 10</b>	<b>NEGATIVO</b>

## 6.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2

Neste experimento, todas as fêmeas hamsters que foram inoculadas com  $10^2$  oocistos de *T.gondii* (cepa Prugniaud via oral) durante a gestação, apresentaram títulos positivos na prova de Aglutinação Direta. Os seus filhotes apresentaram 42,9% de positividade na prova de Aglutinação Direta quando bioensaiados em camundongos. Quando três fêmeas adotaram filhotes vindo de mães livres de infecção, que mamaram por três dias e depois, foram bioensaiados, estes apresentaram-se negativos a prova de Aglutinação Direta.

**Tabela 2: Aglutinação direta dos soros de fêmeas Inoculadas com  $10^2$  oocistos de *T.gondii* (cepa Prugniaud via oral). E aglutinação direta de soros de seus filhotes e do soro de alguns filhotes adotados.**

AD HAMSTER	AD FILHOTES	AD FILHOTES ADOTADOS
POSITIVO	POSITIVO	
POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	POSITIVO	
POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

## 7 DISCUSSÃO

Na transmissão congênita durante a etapa crônica da infecção, obtivemos resultados interessantes pois todas as fêmeas de hamsters inoculadas e suas crias apresentaram titulações negativas. Todos os soros tiveram títulos menores que 1:64 na sorologia, dos camundongos bioensaiados, demonstrando que todos os filhotes foram negativos e que não houve a transmissão do *T.gondii* nesta etapa crônica da infecção. Os resultados encontrados evidenciam que o hamster é um modelo experimental que tem apresentado um comportamento semelhante ao que ocorre nos humanos. Esse fato torna-o um modelo que após ser exaustivamente testado poderá ser referência para futuras pesquisas.

Existem outros modelos experimentais como o camundongo CF1, demonstrado anteriormente (Fux *et al.*, 2000). Essas linhagens de camundongos são heterogêneas e com isso mais resistentes a inoculações quando comparadas com as linhagens Balb/C que são linhagens homogêneas. O estudo em camundongos é bastante usado, seu comportamento imunológico em relação ao *T.gondii*, tem várias diferenças em relação ao comportamento em humanos e com isso o torna um modelo limitado.

Em muitos trabalhos testando camundongos Balb/C, verificou-se que a transmissão à ninhada, só ocorria se a infecção acontecesse durante a prenhez. (Roberts e Alexander, 1992; Roberts, Brewer e Alexander, 1994; Thouvenin *et al.*, 1997; Elsaid *et al.*, 2001; Freyre *et al.*, 2006b).

Fux *et al.* (2000), testaram a infecção congênita na fase crônica da infecção em 49 camundongos Balb/C e foi observado problemas reprodutivos durante essa fase da infecção, como hipertrofia do endométrio e miométrio. No nosso experimento nenhuma Hamster apresentou problemas de abortos ou infecções no trato reprodutivo, só tivemos problemas gastrointestinais em seis fêmeas inoculadas, estas vindo a óbito

Freyre *et al.* (2006b), testaram a transmissão congênita durante a etapa crônica da infecção em camundongos. As fêmeas de camundongos, foram

inoculadas com bradizoítos, da cepa Prugniaud e 45 dias mais tarde foram colocadas com machos. Após o nascimento os filhotes eram bioensaiados e realizada aglutinação direta. A transmissão congênita ocorreu em 2 de 10 camundongos inoculadas.

Com camundongos Balb/C, Roberts e Alexander (1992), concluíram ser possível seu uso como modelo para toxoplasmose em humanos e ovinos.

Em camundongos Balb/C quando infectados semanas após colocadas em cria, desenvolvem uma imunidade capaz de proteger totalmente seus embriões, mesmo se a re-infecção ocorrer durante prenhez.

Fux *et al.* (2000), comparou resultados de transmissão congênita quando essas fêmeas eram inoculadas no início da gestação e tratadas, quando no meio da gestação e tratadas e quando inoculadas no final da gestação e não sendo tratadas. Obtiveram alto índice de titulação dos filhotes quando no início e no final da gestação independente de serem ou não tratadas com antibióticos. Isto nos mostra que os camundongos tem respostas imunológicas diferente dependendo do momento da inoculação.

O modelo rata tem sido extensivamente usado para o estudo da transmissão congênita e da imunidade contra a toxoplasmose. As linhagens de ratas empregadas: Wistar, Long Evans, Fischer e Sprague-Dowley têm mostrado muitas variações individuais em sua resistência natural a toxoplasmose. Quando usadas cepas em linhagens de ratas resistentes não se obtiveram resultados promissores. Isto demonstra que este modelo tem limitações importantes, para o estudo (Dubey e Shen, 1991; Zenner *et al.*, 1993; Dubey e Frenkel, 1998; Paulino e Vitor, 1999; Freyre *et al.*, 1999a; Freyre *et al.*, 2003a; Freyre *et al.*, 2003b; Freyre *et al.*, 2006a; Freyre *et al.*, 2006c).

Dubey *et al.* (1999) inocularam ratas (Sprague-Dawley e Wistar) com 1.000.000 taquizoítos RH, que permaneceram clinicamente normais, enquanto camundongos (Swiss Webster), inoculados com apenas 1 taquizoíto morreram com toxoplasmose aguda.

A transmissão crônica da toxoplasmose foi estudada por Freyre *et al.* (1999), inoculando 89 ratas, com 7 cepas de *T. gondii*, 2 meses antes de serem postas com machos. Após o bioensaio das ninhadas foram detectados 10% de transmissão transplacentária.



Experimentos anteriores inoculando fêmeas com cepas diferentes das usadas para desafiá-las durante a gestação, mostra a urgência de usarmos estas técnicas em hamsters para estudar seu comportamento de uma forma mais complexa, assim como já usados em outros modelos experimentais.

Em nosso segundo experimento, objetivamos verificar a transmissão congênita aguda e lactogênica em Hamsters. Das 7 fêmeas prenhas inoculadas via oral com a cepa Prugniaud na dosagem de  $10^2$ , todas as fêmeas apresentaram-se positivas e seus filhotes apresentaram uma taxa de 42.9% de positividade durante a fase aguda da infecção por *T.gondii*. Os soros de filhotes adotados de mães livres, todos foram negativos, comprovando que o leite destas fêmeas inoculadas, não teria potencial de infectar esses filhotes e que essa via de infecção não é mais comum do que a transplacentária.

O comportamento fisiológico dos animais depende de manejos adequados, como temperaturas ajustadas, um fotoperíodo de 12 horas por dia. Sua reprodução se dá mais à tardinha.

As fêmeas entram no cio de três em três dias aproximadamente se caracterizando por uma secreção amarelada na vulva, isto garante que ao colocar a fêmea junto ao macho eles não brigariam, o que na prática nem sempre ocorre desta forma.(figuras 4 e 6).

O trabalho propõem que se alojem sempre 4 fêmeas para um macho, na prática não obtivemos bons resultados, pois ocorreram muitas brigas entre eles, principalmente das fêmeas entre si. Quando se colocam as fêmeas no cio em horários inadequados como de dia as fêmeas muitas vezes ficam agressivas com os machos, o melhor é sempre escolher o final do dia. Caso os animais se aceitem bem não é recomendado deixar os casais muitos dias juntos, pois isto faz com que eles não cruzem mais.

Algumas fêmeas apresentam canibalismo com suas ninhadas, durante o experimento pudemos observar uma fêmea com este comportamento. É possível que tenha havido mais casos em horários em que estavam sozinhas, pois várias fêmeas diagnosticadas como prenhas, não pariram.

Durante o experimento tivemos problemas de reprodução, muitas fêmeas não conceberam, isto é um dos motivos da complexidade deste modelo, e nossos resultados estão diretamente ligados ao nascimento dos filhotes. Algumas fêmeas

(seis) ao todo apresentaram sintomatologia clínica como diarreia e óbitos alguns dias após terem sido inoculadas.

Houveram problemas com a cepa Prugniaud, em determinado momento deste experimento foi observado ao microscópio que os oocistos estariam inviáveis, entramos em contato com o Professor Freyre, no qual confirmou isto, e relatou que estava com dificuldades em produzir mais oocistos naquele momento, mas que nos meses subsequentes as cepas estariam disponíveis.

Freyre *et al.* (2001b), infectaram ratas com 15 dias de prenhes, utilizando 12 diferentes cepas e obtiveram 44% de transmissão transplacentária.

Freyre *et al.* (2003b) realizaram infecção com 6 cepas de oocistos, em 53 ratas com 15 dias de gestação, os filhotes nascidos foram bioensaiados em camundongos e posteriormente realizada a aglutinação direta, obtiveram 51% de transmissão transplacentária.

A proteção conferida à ratas quando inoculadas dois meses antes da gestação com duas cepas diferentes e desafiadas com uma terceira cepa durante a gestação, mostrou que dependendo da cepa o comportamento imunológico tem diferenças significativas. Isto é importante saber no momento de confeccionar uma vacina (Freyre *et al.*, 2006a).

Em outra pesquisa Freyre *et al.* (2006c), inocularam ratas Sprague-Dawley dois meses antes da concepção com a cepa RH (taquizoítos), Prugniaud (ooocistos) e ME (cistos). Doze dias após a cópula as fêmeas foram desafiadas com  $10^3$  cistos das cepas Prugniaud, Elg, M3, M-7741 ou Hopa-hopá, ou  $10^4$  oocistos das mesmas cepas. Os filhotes foram bioensaiados em camundongos e pesquisaram anticorpos. Nos animais imunizados com RH e desafiados com cistos ocorreram 38,3% de transmissão, e nos animais desafiados com oocistos houve 33,3%. Nos animais imunizados com cistos e desafiados com cistos detectou-se 17% de transmissão, e nos animais desafiados com oocistos obtiveram 48,2%. Mostrando que não só a diferença de cepas é importante como também se ela é em forma de cisto ou taquizoíto.

A importância de serem testados outros modelos consiste que particularmente os camundongos apresentam muitas vantagens, porém, em condições naturais, além de haver transmissão vertical durante a infecção crônica, ocorre também nas sucessivas gerações de filhotes, o que indica que o uso deste animal, não é o

melhor modelo para a toxoplasmose humana (Remington, Jacobs e Melton, 1961. Berveley, 1959 apud Innes, 1997).

Também, sabe-se que os camundongos são muito sensíveis à infecção por *T. gondii*, sendo que seu uso para o estudo da toxoplasmose congênita, pode, não ser o ideal.

Em um experimento em que foram desafiadas fêmeas camundongos Balb/c durante a prenhez, para demonstrar infecção aguda com a cepa Prugniaud, houve diferenças de positividade quando a dose foi maior. Freyre neste mesmo trabalho inoculou fêmeas com cepas Prugniaud não obteve resultados positivos no bioensaio dos filhotes, destes alguns sofreram canibalismo por parte da mãe adotiva.

No nosso experimento não houve canibalismo as fêmeas não tiveram problemas quanto a adoção mesmo que os filhotes não fossem colocados exatamente com os mesmos dias que os filhotes legítimos.

Existem poucos relatos sobre trabalhos em Hamsters. (Freyre 2006, Comunicação Pessoal), verificou que a transmissão da cepa Prugniaud se produziu em 20% de hamsters portadores de infecção crônica, durante a primeira gestação posterior a inoculação, e em 0% durante a gestação subsequente.

O Modelo Hamster realizado por Frenkel, Freyre e Smith (1986), consistiu em proteção limitada do mutante ts4 de *T.gondii* contra desafios provocados durante a gestação de hamsters. Neste caso o autor declara que a dose de desafio utilizada foi desproporcional em relação ao peso corporal.

Esta linha de pesquisa visa contribuir para o estudo da Toxoplasmose e no futuro viabilizar testes vacinais para humanos e animais.

## 8 CONCLUSÕES

Não ocorreu transmissão congênita do *T.gondii*, durante a fase crônica da infecção no modelo Hamster.

Ocorreu transmissão congênita durante a fase aguda

Não ocorreu transmissão lactogênica .

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. Scientific Publication, n. 503. Pan American Health Organization/World Health Organization, Washington – EUA, 1987, 963 p.

ALEXANDER, J.; HUNTER, C.A. Immunoregulation during Toxoplasmosis. IN:LIEW, F.Y. COX, F.E.G. **Chemical Immunology**, Karger, 1998, 204 p.

AMATO NETO V.; COTRIM, J.X.; LAUS, W.C.; GOMES, M.C.O. Nota sobre o encontro do *Toxoplasma gondii* em sangue destinado à transfusão.. **Rev. Inst. Méd. Trop.** São Paulo, v.5, p.68-69, 1963.

AMENDOEIRA , M.R.R. **Tentativa de Evidenciação do *Toxoplasma gondii* em Saliva e/ou Amígdalas em Dois Grupos de Indivíduos do Rio de Janeiro – Aspectos Sorológicos**. IOC – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1980, 82 pp. (Tese de Mestrado).

APT, W.; Thiermann E., Niedmann, G.; Pasmanik S. **Toxoplasmosis**. Universidad de Chile Santiago, 1973,163pp.

ARAUJO, F.A.P. **Avaliação soroepidemiológica de anticorpos para *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 em soros de suínos (*Sus scrofa*) da região da Grande Erechim, RS – Brasil detectados através das técnicas de imunofluorescência indireta e de imunoenzimática**. Rio de Janeiro – RJ. 125 f. Tese (Doutorado). Instituto Oswaldo Cruz, 1999.

AUGUST, J.R.; CHAISE, T.M. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of America: Small Animal Practice**, v. 17, n. 1, p. 55-71, 1987.

BARUZZI R.G. **Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serology survey among the indians of the Upper Xingu River, Central Brazil.** Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo 12; 93-104.1970.

BEOUVAIS B.; GARIN J.F.; LARIVIERE M.; LANGUILLAT G.; GALA H. Toxoplasmose et transfusion. **Ann. Parasitol.** ( Paris) 51: 625-635. 1976.

BLEWETT, D.A.; WATSON, W.A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. II Possible Sources of Infection in Outbreaks of Clinical Diseases. **British Veterinary Journal**, London , v. 139, p. 546, 1983.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária.** 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991, 1263p.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J. do N.; SILVA, E.M.K.da; BORTOLIERO, A.L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 21-25, 1997.

BROWN, J.; JACOBS, L. Adult toxoplasmosis: report of a case due to laboratory infection. **Ann Intern. Med** 44: 565-572. 1956

CAMARGO, M.E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da toxoplasmose. **An. Acad. Nac. Med.**, v. 155, n. 4, p. 236-239, 1995.

CAMARGO, M.E. Toxoplasmose: diagnóstico sorológico. **Bol. Méd. Lab. Bronstein**, Porto Alegre, Ano V, jan/fev, 1996, 4 p.

CHAMBERLAIN, D.M.; DOCTON, F.L.; COLE, R.C. Toxoplasmosis II. Intrauterine infection in dogs, premature birth and presence of organisms in milk. **Proc. Soc. Expt. Biol. Med.**, v. 82, p. 198-200, 1953.

CHEMELLO, D.; ECKERT, G.U.; TEIXEIRA, C.G. Imunidade a parasita. In: SCROFERNEKER, M.L. & POHLMANN, P.R. **Imunologia Básica e Aplicada.** Porto Alegre: Sagra Luzatto. 1998. 373 p.

CHOROMANSKI, L.; FREYRE, A.; BROWN, K.; POPIEL, I.; SHIBLEY, G. Safety aspects of a vaccine for cats containing a *Toxoplasma gondii* mutant strain. **J. Euk. Microbiol.** , v.4, p. 5-8, 1994.

COTTIELEER, C. & FAMERE, I. **Anticorpos antitoxoplasmiques chez le mouton et l'agneu em Belgique, Implications em epidemiologiques et alimentaires.** **Journal of Protozoology**, New York, v. 31, p. 67, 1984.

COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; CAMILLO-COURA, L.; MARZOCHI, M.C.A. Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6.079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas durante os anos de 1971 a 1877. **Rev. Inst. Med Trop.** São Paulo 23, 48-56, 1981.

DENKERS, E.Y.; CASPAR, P.; SHER, A. *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor V B5 – bearing CD8 + lymphocytes. **J. Exp. Med.**,, v. 180, p. 985-994, 1994.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test dor diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **J. of Clin. Microb.** , v.11, no. 6, p. 562-568, 1980.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in pigs. **Vet. Parasit.** n. 19, p. 181-223, 1986.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man.** CCR Press: Boca Raton, Florida. 1988, 218 p.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Nova doença fatal causada por protozoários, recém-identificada em cães. **Cães & Gatos**, Porto Feliz, n.22, Ano 3, p. 5-11, 1988.

DUBEY, J.P.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; THULLIEZ, P. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. **Parasitology**, 115 (Pt.1), 9-14, 1997.

DUBEY, J.P. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitology*, aug 83 (4), 755-7, 1997.

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

DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet. Parasit.**, n. 84, p. 349-367, 1999.

DUBEY, J.P.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; FRENKEL, J.K. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* IN RATS AND MICE. **J. Parasitol.**, v. 85, n.4, p. 657-662, 1999.

DUBEY, J.P.; SHEN, S.K. Rat model of congenital toxoplasmosis. **Inf. Immunity** v. 59, p. 3301-02, 1991.

DUBEY, J.P.; TOWLE, A. Toxoplasmosis in sheep. A review and annotated bibliography. **Commonwealth Institute of Parasitology** (ed) 8t St. Albans Herts UK. 1986.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in dogs: a review. **Canine Practice**, v. 12, n. 6, p. 7-25, 1985.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 205, n. 11, p. 593-598, 1994.



DUBEY, J.P. Toxoplasmosis, sarcocystis, isosporosis, and cystoisosporosis. In: PALMER, S.R.; SOULSBY, L. and SIMPSON, D.I.H. **Zoonosis**. Oxford Medical Publication. 1998. 948p.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.17, n.6, p. 1389-1404, 1987.

DUBREMETZ, J.F. Biologie du toxoplasme et toxoplasmose. **Annales de L'institut Pasteur**, Paris, v. 10, n. 1, p. 107-112, 1999.

EICHENWALD, H. F. Experimental toxoplasmosis. – Transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice. **Am J. Dis Child** 76: 307-315. 1948.

ELSAID, M.M.A.; MARTINS, M.S.; FREZARD, F.; BRAGA, E.M.A.; VITOR, R.W.A. Vertical toxoplasmosis in a murine model, protection after immunization with antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 99-104, 2001.

FARREL, R.L.; DOCTON, F.L.; CHAMBERLAIN, D.M.; COLE, C.R. Toxoplasmosis. *Toxoplasma* isolated from swine. **Am. J. Vet. Res.**, n. 13, p. 181-184, 1952.

FELDMAN, H.; MILLER, L. Serological study of toxoplasmosis prevalence. **Am. J. Hyg.**, v. 64, p. 320-335, 1956.

FERRARONI, J.J.; MARZOCHI, M.C.A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupos humanos da Amazônia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** Rio de Janeiro 75: 99-109. 1980.

FISHER, S.; e REID, R.R. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and contact with animals in the home. **Med. J. Aust** I: 1275- 1277. 1973.

FRENKEL, J.K. Advances in the biology of sporozoa. **Z.Parasitenkd** 45:125-162, 1974.

FRENKEL, J.K. Common questions on toxoplasmosis: veterinary and medical public health considerations. **Veterinary Small Animal Clinic**, v. 77,n. 8, p. 1188-1196, 1982.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidian oocysts, **Science**, v. 167, p. 893-986, 1970..

FRENKEL, J.K.; FREYRE, A.; SMITH, D.D. Test of nonpersistent ts-4 vaccine in mice and hamsters: Apperance of immunity ve persistent, and protection against transplacental infection. **Program ad abstracts of the 61<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society of Parasitologists**: Abstract Nr. 88, 1986.

FRENKEL, J.K. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. **Bull NY Acad Med** v.50, p.182-191. 1974b.

FRENKEL, J.K., PFEFFERKORN, E.R.; SMITD, D.D.; FISHBACK, J.L. Prospective vaccine prepared from a new mutans of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **Am. J. Vet.** V.52: p.759-763, 1991.

FRENKEL, J.K. Toxoplasnose. In: VERONESI, R. & FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo, Atheneu, 1997, 1803 p.

FREYRE, A.; COLOMBO, A.; D'ANGELO, J.M.; FALCÓN, J. Prevalencia de la infección toxoplásmica en cerdos en el Uruguay y su significación zoonotica. Avances en **Ciencias Veterinarias**, v. 6, n. 2, 166-171, 1991.

FREYRE A.; BONINO, J.; FALCÓN, J.; CASTELLAS, D; CORREA, O.; CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Vet. Parasitology**, 81:85-88, 1999.

FREYRE, A.; CHOMARANSKI, L.; FISHBLACK, J.L.; POPIEL, I. Immunization of cats with tissue cyst, bradyzoites, and tachyzoites of the t-263 strain of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, 79(5):716-719, 1993.

FREYRE, A.; CORREA, O.; FÁLCÓN, J.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; VENZAL, J.M. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. **Parasitol. Res.** 87:941-944, 2001a.

FREYRE, A.; FÁLCÓN, J.; CORREA, O.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; VENZAL, J.; MORGADES, D. Cysts burden in the brain of Wistar rats fed *Toxoplasma* oocysts. **Parasitol. Res.** 89:342-344, 2003a.

FREYRE, A.; FÁLCÓN, J.; CORREA, O.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; VENZAL, J. Residual infection of 15 *Toxoplasma* strains in the brain of rats fed cysts. **Parasitol. Res.**, v.87, p. 915-918, 2001b.

FREYRE, A.; FÁLCÓN, J.; MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ, M. Modelos animales para el estudio de la protección vaccinal contra la toxoplasmosis. **Comunicação pessoal** (2006).

FREYRE, A.; FÁLCÓN, J.; MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Differential protection rates by two strains against cyst formation in a rat model. **Exp. Parasitol.**, 114:265-270, 2006a.

FREYRE, A.; FÁLCÓN, J.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; VENZAL, J.; MORGADES, D. Fetal toxoplasma infection after oocyst inoculation of pregnant rats. **Parasitol. Research** 89: 352-353, 2003b.

FREYRE, A.; FÁLCÓN, J.; MÉNDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, L.; GONZÁLEZ, M. Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. **Exp. Parasitol.**, 113: 154-160, 2006b.

FREYRE, A.; FÁLCÓN, J.; MÉNDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, L.; GONZÁLEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Partial cross-protection among several strains of

the parasite against congenital transmission in a rat model. **Exp. Parasit.**, 112:8-12, 2006c.

FREYRE, A.; FALCÓN, J. **Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis**. Departamento de Publicaciones de la Universidad (Ed.)(Uruguay), 339pp. 1989.

FREYRE, A. **Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis**. Montevideo: Departamento de Publicaciones de la Universidad de la Republica do Uruguai, 1989. 332p.

FREYRE A. Vacunas contra *Toxoplasma*. **Segundo Congresso Internacional de Toxoplasmosis**. Santa Fé Bogotá, Colombia, Junio 4-6 de 1998.

FUX, B.; FERREIRA, A.M.; CASSALI, G.D.; TAFURI, W.L.; VITOR, R.W.A. Experimental toxoplasmosis in Balb/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 95(1):121-126, 2000.

GAGNE, S.S. Toxoplasmosis. **Vet. Parasit.**, v.8, n.3, p.122-126, 2001.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. de. Soroprevalência , epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Rev. Panam. Salud Publ.**, v. 6, n. 3, p. 157-163, 1999.

GARCIA-VASQUEZ, Z.; ROSARIO-CRUZ, R.; DIAZ-GARCIA, G.; HERNANDEZ-BAUGARTEN, O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four mexican states. **Prev. Vet. Med.**, v. 17, p. 127-132, 1993.

GIOVANNONI, M. **Considerações sobre o *Toxoplasma* e a toxoplasmose. Isolamento do agente etiológico e pesquisa de anticorpos em cães**. Curitiba-PR. 64p. Tese (Mestrado). Escola Superior de Agricultura e Veterinária, 1958.

GIOVANNONI, M.; MELLO, M.J.; NÓBREGA, P. Ensaio de transmissão da toxoplasmose por insetos hematófagos. **Arq. Inst. Biol.** (São Paulo) v. 21, p.1-4. 1952.

GLASER, C.A.; ANGULO, F.J.; ROONEY, J.A. Animal associated opportunistic infections among persons infected with the human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.** v.18, p.136-144, 1992.

GOLDFAR, J. Breastfeeding. AIDS and other infectious diseases. **Clin. Perinatol** 20: 225-243. 1993.

GRÜNSPAN, E.D. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em praça pública da cidade de Santa Maria. RS, Brasil. Santa Maria-RS. p.68 (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, 1996.

GUIMARÃES, A.M.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; ALMEIDA, T.M.B. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. **Arq. Bras. Med. Vet. E Zoot.** Belo Horizonte, v. 44, n. 1, p. 69-71, 1992.

HERWALDT, B.; JURANEK, D.D. Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis and toxoplasmosis. **Am. J. Trop. Med Hyg** 48: 313-323. 1993.

HIRT, J. Com. Pers. a A. Freyre, 2001.

HUTCHISON, W.M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 206: 961-962. 1965

HUTCHISON W.M. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii* **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, n.61, p. 80-89, 1967.

INNES, E.A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comp. Immun.Microbiol. infect. Dis.**v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

JAMRA, L.M.F. Contribuição para a Epidemiologia da Toxoplasmose: Inquérito em 100 Famílias de uma Área da Cidade de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1964, 96pp. (Tese de Doutorado).

JAMRA, L.M.F.; DEANE, M.P.; GUIMARÃES, B.C. On the isolation of *Toxoplasma gondii* from human food of animal origin: partial results in the city of São paulo (Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, V. 11, P. 169-176. 1969.

JACOBS, L.; MELTON, M.L. Toxoplasmosis in chickens. **J. Parasitol** 52: 1158-1162. 1966.

JACOBS, L.; REMINGTON, J.S.; MELTON, M.L. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. **J. Parasit.**, v. 46, p. 23-28, 1960.

KASPER, L.H.; WARE, P.L. Recognition of stage-specific oocyst sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. **J.Clin. Invest.** V.75, p. 1570-1577. 1985.

KATZER, L.H.; LAGAGGIO, V.R.A.; BARCELOS, A.S.; ALVES, C.S.P.; DOYLE, R.L.; NOAL, S.A. Estudo da prevalência da toxoplasmose em alunos do curso de Medicina Veterinária da UFSM –dados preliminares. In:IV Jornada Integrada de Pesquisa, Extensão e Ensino, Universidade Federal de Santa Maria –RS, 1997, **Anais: UFSM**, , p. 714. **Parasitol** 43: 308-314. 1997.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. IN NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10 a. ed, São Paulo: Atheneu, 2000, 428p.

KIMBALL, A.C.; BAUER, H.; SHPPARD, C.G.; HELD, J.R.; SCHUMAN, L.M. Studies on toxoplasmosis III – *Toxoplasma* antibodies in obstetrical patients correlated with resistance, animal contact and consumption of selected foods. **Am. j. Hyg** v.71; p. 93-119. 1960.

LEVINE, N.D., CORLISS, J.O.; COX, F.E.G., DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.;

MERINPELD, E.G.; PAG, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**. Ames, Iowa State University Press, EUA, 1985.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; BUTLER, J.M.; BLAGBURN, B.L.; Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 73, p. 27-33, 1997.

LUFT, B.; HAFNER, R. Toxoplasmic encephalitis. **AIDS** 4, 593-595. 1990.

MAGALDI, C.; ELKIS, H.; PATTOLI, D.; COSCINA, A.L. Epidemic of toxoplasmosis et a University in São José dos Campos, São Paulo- Brazil. **Revist Am Mirobiol** 11: 5-13. 1969.

MELAMED, J.; RAFFIN, N.N.; AGNES, M.J. Toxoplasmose no Rio Grande do Sul- Inquérito sorológico no interior do Estado. **Rev Pat Trop** 10(1): 1-7. 1981.

MELAMED, J. Retinocoroidite Toxoplásmica. Faculdade de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 210p. (Tese de doutorado). 1991.

MORRIS, J.G. Food safety symposium: The safety of foods of animal origin. **JAVMA**, vol. 209, n. 12, 1996.

MUÑOZ, P. Infecciones congênitas. In: Atias A (ed.), **Parasitologia Médica**. Mediterrâneo Santiago Chile 1995. 273p.

NETO, E.C.; ANELE, E.; RUBIM, R.; BRITES, A.; SCHULTE, J.; BECKER, D.; TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **Int. J. Epidemiol**, v. 29, n. 5. p. 941-7, 2000.

NETO, V.A.A.; MARCHI, C.R. Toxoplasmose In CIMERMAN, B; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. São paulo: Atheneu, 1999, 375p.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. C R Acad Sci (Paris) 147: 763-766. 1908

NUSSENZWEIG, R.S.; DEANE, M.P. Estudo sobre a transmissão do *Toxoplasma gondii*.I –Experiências com triatomíneos. **Revista Bras. Malariol Infect** 10: 543-550. 1958

OSÓRIO, M.R.; GARCIA, V.C.; MALDONADO, J.L.; GONZALEZ, F.P. Soroepidemiologia de la toxoplasmosis I:0 Estidio realizado em seuros humanos por la tecnica de immunofluorescência indireta. **Revist. Iber Parasitol** 37: 123-132. 1977.

PAIM, G.V.; QUEIROZ, J.C. Capacidade da *Musca domestica* para albergar *Toxoplasma gondii*. **Arq Hig. Saúde Pública** (São Paulo) 28: 213-216. 1963.

PAULINHO, J.P.; VITOR, R.W. Experimental congenital toxoplasmosis in *Wistar* and *Holtzman* rats. *Parasite*,6 (1), 63-66, Mar 1999.

PINTO, P.L.S.; AMATO-NETO, V.; BRAZ, L.M.A.; BRITO, T. Investigaçãõ experimental sobre a possibilidade de transmissão da infecçãõ pelo *Toxoplasma gondii* por meio do leite. **Rev Soc. Bras Med Trop** 26: 251-252. 1993.

PIZZI, H.L. **Toxoplasmosis**.1'ed. Argentina: Rhône Poulenc Rorer Argentina, 1997, 91p.

RAWAL, B.W. Toxoplasmosis: a dye-test survey on sera from vegetarians and meat enter in Bombay. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** V. 53. p. 61-63. 1959.



RIEMANN, H.P.; MEYER, M.E.; THEIS, J.H.; KELSO, G.; BEHYMER, D.E. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. **J. Pediatr.**, n. 87, p. 573-576, 1975.

REMINGTON, J.S.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J. O. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 3<sup>a</sup> ed. Editora Philadelphia, W. B. Saunders, p. 83-195, 1990.

REMINGTON, J.S.; JACOBS, L.; MELTON, M.L.; Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. **Journal of Infectious Diseases**. P. 108-173, 1961.

REMINGTON, J.S. TOXOPLASMOSIS IN THE ADULT. **Bull NY Acad Med** 50: 211-227. 1977

REYNOLDS, WALLS, K.W.; PFEIFFER, R.I. Generalized toxoplasmosis following renal transplantation. **Arch Intern Med** 118: 401-405. 1966

RICCIARDI, I.D. **Prevalência de Reatores Humanos ao *Toxoplasma gondii* no Brasil. Inquérito Sorológico Piloto**. Instituto de Microbiologia, Universidade federal do rio de Janeiro, 1976, 222 p. (Tese de doutorado).

RIEMANN, H.P.; WILLADSEN, C.M.; BERRY, L.J.; BEHYMER, D.E.; GARCIA, Z.V.; FRANTI, C.E.; RUPPANNER, R. Survey for toxoplasma antibodies among sheep in western United State. **JAVMA**, v.171, no. 12, p.1260-1264, 1977.

ROBERTS, C.W.; ALEXANDER, J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in balb/c mice infected for first time during pregnancy. **Parasitology**, v. 104, no. 1; p. 19-23. 1992.

ROBERTS, C.W.; BREWER, J.M.; ALEXANDER, J. Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. **Vaccine** , 12 (5): 1389 –94. 1994.

ROSE, A.G.; UYS, C.J.; NOVITSKY, D.; COOPER, D.K.; BARNARD, C.N.;  
Toxoplasmosis of donor and recipient heart after heterotropic cardiac transplantation.  
**Arch Pathol Lab Med** 107: 368-373. 1983.

RYNING, F.W.; McLEOD, R.; MADDOX, J.C.; HUNT, S.; REMINGTON, J.S.  
Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. **Ann Intern  
Med** 90: 47-49. 1979.

SAARI, K.M.; RAISANEN, A.S. Transmission of toxoplasmosis by trophozoites, **Lancet**  
2: 1077. 1977.

SACKS, J.J.; ROBERTO, R.R.; BROOKS, N.F. 1982. Toxoplasmosis infection  
associated with raw goat's milk. **JAMA** 248- 1732.

SILVA, N.R.S.; CHAPLIN, E.L.; MENDEZ, L.D.V.; ARAÚJO, F.A.P. Determinação de  
anticorpos toxoplásmicos em soros de suínos obtidos em matadouros, na região do  
Alto Taquarí, RS, Brasil. **Arq, da Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 9, p. 33-38,  
1981.

SORGOB, F.; JAMRA, K.F.; GUIMARÃES, E.C.; DEANE, M.P. Toxoplasmose  
espontânea em animais domésticos e silvestres em São Paulo. **Rev. Inst. Med.  
Trop. SP**. São Paulo, v. 14, n. 5, p. 314-320, 1972.

SPALDING S.M. **Acompanhamento de gestantes com risco de transmissão  
congenita por *Toxoplasma gondii***, Nicolle & Manceaux, 1909- Diagnóstico e  
aspectos epidemiológicos. Tese Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro  
2000.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Infecções bacterianas, riquetsiais,  
protozoais, e outras. IN: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina Interna Veterinária**,  
3ª ed. São Paulo: Manole Ltda, 1992, 2557p.

TABOADA.J.; MERCHANT, S.R. Infecções por protozoários e por outras causas. In ETTINGER, S.J. ; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ª. ed. São Paulo: Manole Ltda., v.1,1997. 1495 p.

THOUVENIN, M.; CANDOLFI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J.P.; KIEN, T. Imune response in a murine modelo f congenital toxoplasmosis increased susceptibility of pregnant mice and transplacental pasaje of *Toxoplasma gondii* are tipe-dependent. **Parasitologia Roma**, v. 39, n.4, p. 279-283, 1997.

ULON, S.N. **Inquérito sorológico de infecção toxopásmica em ovinos abatidos em Santa Maria, RS, e sua repercussão na saúde pública**. Santa Maria. 78. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1996.

WALLS, K.W.; SCHULTZ, M.G. Public health aspects of toxoplasmosis. **J. Am. Med Vet Assoc** 153: 1775- 1779, 1968.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A.H. Toxoplasmosis in man and swine – an investigation of the possible relationship. **JAVMA**, v. 161, n.3, p. 229-232, 1956.

WENDEL, S. Current concept on transmission of bacteria and parasite by blood components. **J Euk Microbiol** 41; 161-174. 1994.

ZENNER, L.; DARCY, F.; CESBRON-DELAUW, M.F.; CAPRON, A. Rat model of congenital toxoplasmosis rate of transmission of three *Toxoplasmo gondii* strain to fetuses and protective effest of a chronic infection **Inf .Imunity**, 61,360-63, 1993

