

ISOLAMENTO DO *Toxoplasma gondii* NICOLLE & MANCEAUX,
1909 (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) DE GALINHAS
NATURALMENTE INFECTADAS

CATHIA MARIA SERRA PEIXOTO

1990

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

ISOLAMENTO DO *Toxoplasma gondii* NICOLLE & MANCEAUX,
1909 (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) DE GALINHAS
NATURALMENTE INFECTADAS

CATHIA MARIA SERRA PEIXOTO

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR
CARLOS WILSON GOMES LOPES

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciências em Medi-
cina Veterinária - Parasitolo-
gia Veterinária

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO
SETEMBRO, 1990

TÍTULO DA TESE

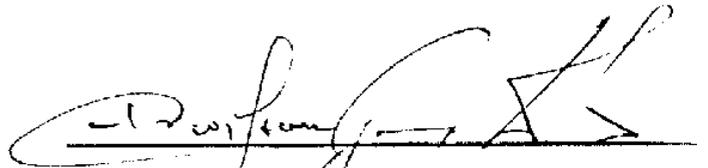
ISOLAMENTO DO *Toxoplasma gondii* NICOLLE & MANCEAUX,
1909 (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) DE GALINHAS
NATURALMENTE INFECTADAS

AUTOR

CATHIA MARIA SERRA PEIXOTO

TESE APROVADA EM: 21/09/1990

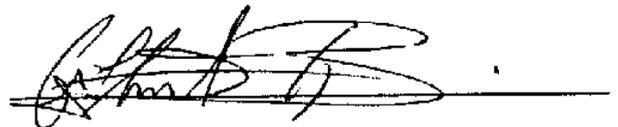
CARLOS WILSON GOMES LOPES



PAULO CESAR FIGUEIREDO



GILBERTO GARCIA BOTELHO



*Ao Paulo e à Ana Lydia,
por terem compreendido,
com amor e carinho, os
momentos que não esti-
ve presente.*

*Aos meus pais e irmãos
pelo apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente aos professores:

- CARLOS WILSON GOMES LOPES, Professor Adjunto do Instituto de Biologia - Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

- PAULO CÉSAR FIGUEIREDO, Professor Adjunto do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

- PAULO FERNANDO DE VARGAS PEIXOTO, Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria.

- WILSON JACINTO SILVA DE SOUZA, Membro da Comissão de Orientação, Pesquisador do Departamento de Protozoologia da

Fundação Instituto Oswaldo Cruz.

Agradeço também à TERESA CRISTINA BERGAMO DO BOMFIM,
colega do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Pa-
rasitologia Veterinária.

BIOGRAFIA

Cathia Maria Serra Peixoto, filha de Manoel Alves Serra e Ida Barrientos Serra, casada, brasileira, natural do Estado do Rio de Janeiro, onde nasceu em 14 de maio de 1963.

Em 1981 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Itaguaí, RJ, obtendo o diploma de médico veterinário em 25.08.1985 e inscrita no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado do Rio de Janeiro (CRMV -5, N° 3.343) em 26.06.1986.

Estagiária do Setor de Anatomia Patológica da Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal-EMBRAPA - Itaguaí (1984-1985).

Estagiária no Institut für Veterinär Pathologie der Justus-Liebig Universität, Giessen, República Federal da Alemanha, no período de 15.10.1985 a 15.06.1986.

Bolsista do CNPq, em nível de Aperfeiçoamento Profissional, durante o ano de 1987, sob orientação do Professor Carlos Wilson Gomes Lopes, do Departamento de Parasitologia Vete-

rinária da UFRRJ.

Ingressou em 1988 no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária da UFRRJ, ao nível de Mestrado.

CONTEÚDO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico	3
2.2. Classificação	4
2.3. Aspectos biológicos	5
2.3.1. Ciclo "Enteroepitelial"	6
2.3.2. Ciclo "Extra-intestinal"	7
2.3.3. Esporulação	8
2.4. Aspectos morfológicos	8
2.5. Resistência das formas infectantes	10
2.6. Modos de transmissão	11
2.7. Diagnóstico laboratorial	13
2.8. Toxoplasmose no homem e nos animais domésticos	15
2.9. Toxoplasmose em galinhas	17
2.9.1. Ocorrência da doença	17
2.9.2. Toxoplasmose experimental	19
2.9.3. Sintomatologia e lesões	23

	Página
2.9.3.1. Infecção natural	23
2.9.3.2. Infecção experimental	25
2.9.4. Diagnóstico laboratorial	26
2.9.5. Importância das galinhas como hospedei- ros intermediários	28
2.10. Toxoplasmose em camundongos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. obtenção dos animais	31
3.1.1. Origem das aves	31
3.1.2. Origem dos camundongos	32
3.2. Parasitemia das aves	32
3.3. Necropsia das aves	32
3.3.1. Exame do cérebro	33
3.3.2. Coleta e processamento de órgãos para o isolamento	33
3.4. Inoculação em camundongos	33
3.4.1. Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> nos camun- dongos	34
3.5. Manutenção do <i>Toxoplasma gondii</i>	35
3.6. Mensuração	35
3.7. Fotomicrografia	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Necropsia das aves	38
4.2. Exame do cérebro das aves	38
4.3. Detecção da parasitemia	39
4.4. Isolamento do <i>Toxoplasma gondii</i> de órgãos de ga-	

	Página
linhas naturalmente infectadas	39
4.5. Diagnóstico de toxoplasmose nos camundongos inoculados com suspensão de órgãos de galinhas naturalmente infectadas	41
4.5.1. Sintomatologia dos camundongos	41
4.5.2. Necropsia dos camundongos	44
4.5.3. Presença de formas evolutivas (cistos) do <i>Toxoplasma gondii</i> no cérebro dos camundongos	44
4.5.4. Presença de formas evolutivas (taquizoítas) do <i>Toxoplasma gondii</i> no pulmão dos camundongos	53
4.5.5. Exame histológico dos camundongos	54
4.6. Manutenção do <i>Toxoplasma gondii</i> em laboratório através de passagens em camundongos	69
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Demonstração do parasitismo tecidual pelo <i>Toxoplasma gondii</i> , em galinhas naturalmente infectadas, verificado, indiretamente, através de inoculação em camundongos	40
TABELA 2. Número e percentual de isolamentos do <i>Toxoplasma gondii</i> nas galinhas examinadas e nas galinhas positivas	42
TABELA 3. Número de dias, após a inoculação, em que ocorreu a morte dos camundongos, nos quais foi possível o isolamento do <i>Toxoplasma gondii</i>	45

TABELA 4. Presença de cistos e de taquizoítas do <i>Toxoplasma gondii</i> em 22 camundongos inoculados com órgãos de galinhas naturalmente infectadas	46
TABELA 5. Dimensões de cistos do <i>Toxoplasma gondii</i> , em esfregaços de cérebro de camundongos inoculados com órgãos de galinhas naturalmente infectadas	51
TABELA 6. Dimensões dos taquizoítas extracelulares do <i>Toxoplasma gondii</i> , em impressões de pulmão de camundongos inoculados com órgãos de galinhas naturalmente infectadas	61
TABELA 7. Resultados obtidos através das passagens de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos inoculados por via subcutânea a partir do homogeneizado de cérebro, pulmão, fígado e baço dos camundongos 280 e 283, os quais foram inoculados com suspensão de cérebro e coração, respectivamente, da galinha número 15	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Fluxograma de cinco passagens do <i>Toxoplasma gondii</i> realizadas em camundongos a partir do homogeneizado de cérebro, pulmão, fígado e baço, provenientes dos camundongos de números 280 e 283, os quais foram inoculados com cérebro e coração, respectivamente, da galinha de número 15	36
FIGURA 2. Diagrama de isolamentos do <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos inoculados com órgãos de galinhas naturalmente infectadas	43
FIGURA 3. Cisto de <i>Toxoplasma gondii</i> em exame a fresco de cérebro de camundongo, 400 X	48

- FIGURA 4. Figura anterior em maior aumento para visualização da parede cística e dos bradizoítas. Exame a fresco, 1000 X 49
- FIGURA 5. Cistos de *Toxoplasma gondii*, com diferentes tamanhos, em esfregaço de cérebro de camundongo. Giemsa, 100 X 50
- FIGURA 6. Cisto de *Toxoplasma gondii* em esfregaço de cérebro de camundongo. Giemsa, 1000 X 52
- FIGURA 7. Taquizoíta de *Toxoplasma gondii* em impressão de pulmão de camundongo. Notar núcleo de posição central. Giemsa, 1000 X 55
- FIGURA 8. Taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, livres, em impressão de pulmão de camundongo. Notar núcleo de posição subterminal. Giemsa, 1000 X 56
- FIGURA 9. Taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, livres e aglomerados. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X 57
- FIGURA 10. Taquizoíta de *Toxoplasma gondii* apresentando as extremidades arredondadas e o núcleo menos corado. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X 58

- FIGURA 11. Macrófago apresentando formas intracelulares do *Toxoplasma gondii*. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X 59
- FIGURA 12. Cisto de *Toxoplasma gondii*. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X 60
- FIGURA 13. Cisto de *Toxoplasma gondii* em cérebro de camundongos. Notar ausência de reação inflamatória ao redor do cisto. H.E., 400 X 63
- FIGURA 14. Dois cistos de *Toxoplasma gondii*, no interior dos quais se observam bradizoítas com grânulos P.A.S. positivos. Cérebro de camundongo. P.A.S., 1000 X 64
- FIGURA 15. Pneumonia intersticial com a presença de várias formas do *Toxoplasma gondii*. Pulmão de camundongo. H.E., 100 X 65
- FIGURA 16. Endozoítas de *Toxoplasma gondii*, vistos no citoplasma de uma célula da parede alveolar. Pulmão de camundongo. H.E., 1000 X 66

- FIGURA 17. Estrutura semelhante a um cisto de *Toxoplasma gondii* em pulmão de camundongo. H.E., 400X 67
- FIGURA 18. Estrutura semelhante a um cisto de *Toxoplasma gondii* contendo organismos com alguns grânulos P.A.S. positivos. Pulmão de camundongo. P.A.S., 1000 X 68
- FIGURA 19. Fluxograma de passagens do *Toxoplasma gondii* em camundongos e respectivos dias da morte dos roedores inoculados por via subcutânea com homogeneizados de órgãos. A suspensão original foi proveniente dos camundongos 280 e 283, os quais foram anteriormente inoculados com o cérebro e o coração, respectivamente, da galinha de número 15 70

RESUMO

Vinte galinhas foram obtidas no Distrito de Seropédica, Município de Itaguaí, localizado no Estado do Rio de Janeiro. Este Distrito está localizado em terras baixas da área metropolitana da Cidade do Rio de Janeiro, onde se observam algumas características rurais, como a criação de galinhas em quintais. Amostras de cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim, ovário-oviduto e músculo peitoral dessas aves foram inoculadas subcutaneamente em camundongos. *Toxoplasma gondii* foi isolado de 30% dos corações, 20% dos cérebros, 5% dos baços e 5% dos ovário-ovidutos das galinhas examinadas.

A maioria dos camundongos, nos quais obteve-se o isolamento, apresentou sintomatologia, morrendo entre o 12° e o 21° dias pós-inoculação (DPI). À necropsia, o órgão mais afetado foi o pulmão. Cistos foram observados no cérebro desses animais após o 13° DPI. Taquizoítas foram vistos no pulmão dos camundongos mortos naturalmente a partir do 12° DPI; foram ainda observados no pulmão dos camundongos no 30° DPI. No exame his-

tológico, observou-se, como lesão constante, pneumonia intersticial difusa, geralmente, associada à presença do parasito.

O isolamento do *T. gondii* em 30% das galinhas examinadas sugere, indiretamente, uma importante contaminação do meio ambiente com oocistos, procedentes de fezes de gatos naturalmente infectados.

SUMMARY

Twenty adult chickens were obtained at District of Seropédica, Municipality of Itaguaí in the State of Rio de Janeiro. This District is localized within the lowlands of the Metropolitan region of the City of Rio de Janeiro with some rural characteristics. The chickens were raised in contact with soil in backyards. Specimens of brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, ovary-oviduct and pectoral striated muscle were inoculated, subcutaneously, into mice. *Toxoplasma gondii* was isolated in 30% of hearts, 20% of brains, 5% of spleens and 5% of ovary-oviducts of examined chickens.

The majority of mice, in which the isolation was successful, had symptomatology, and died between postinoculation day (PID) 12 and 21. At necropsy, lung was the most affected organ. Cysts were found in their brains after PID 13. Tachyzoites were found in the lungs of mice that died naturally, after PID 12; and were also found at PID

30. Difuse interstitial pneumonia was a constant lesion and usually it was associated with the presence of the parasite.

The isolation of *T. gondii* in 30% of examined chickens suggest, indirectly, an important contamination of the environment with oocysts eliminated in feces of naturally infected cats.

I. INTRODUÇÃO

A literatura sobre o *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909, é uma das mais vastas do mundo e remonta ao início do século XX, e a doença, toxoplasmose, tem sido considerada como uma importante zoonose de caráter cosmopolita.

Na maioria das espécies infectadas pelo *T. gondii*, este protozoário dificilmente tem causado doença clínica. No entanto, a toxoplasmose tem sido uma constante preocupação, em função da gravidade das lesões que pode provocar nas primoinfecções em fêmeas gestantes e, também, da grande capacidade que possui o parasito de se multiplicar em pacientes imunossuprimidos.

Em relação aos animais domésticos, principalmente em ovinos e caprinos, o *T. gondii* pode acarretar prejuízo econômico como agente etiológico de abortos que ocorrem sob a forma de surtos.

Apesar da elucidação do ciclo biológico do *T. gondii*, estabelecendo os felídeos como únicos hospedeiros definiti-

vos, outros aspectos na epidemiologia deste parasito necessitam ser esclarecidos.

Existem indicações de que o solo ao redor das moradias constituem locais favoráveis para a persistência de oocistos viáveis (infectantes) do *T. gondii*, mesmo durante a estação seca, persistência esta atribuída à concentração de gatos na vizinhança. Estas áreas podem funcionar como importante fonte de infecção para animais, inclusive o homem.

A importância epidemiológica das chamadas galinhas de quintal (*Gallus gallus*), decorre de seu constante contato com o solo, tornando-se assim, em áreas de risco, propensas a se infectarem com oocistos esporulados infectantes e/ou com hospedeiros mecânicos dos mesmos. Deste modo, poder-se-ia estimar a contaminação do solo com oocistos procedentes das fezes de felinos infectados, através do isolamento do *T. gondii* de órgãos de galinhas.

O presente trabalho teve como objetivos isolar o *T. gondii* de galinhas naturalmente infectadas, verificar, nestas aves, a distribuição deste protozoário em diferentes órgãos e estudar a patogenicidade, para camundongos, das amostras de *T. gondii* isoladas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O *Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez, simultaneamente, por NICOLLE & MANCEAUX (1908 e 1909) em um roedor norte-africano da espécie *Ctenodactylus gondi* na Tunísia e por SPLENDORE (1908 e 1909) em coelhos no Brasil.

MELLO (1910) descreveu a toxoplasmose no cão; porém com relação ao homem, o primeiro caso foi descrito somente em 1923 por Janku conforme KEAN et al. (1978). A seguir WOLF & COWEN (1937) puderam relatar com detalhes clínico - patológicos a toxoplasmose congênita. Já WOLF et al. (1939 e 1940) conseguiram, pela primeira vez, transmitir experimentalmente para animais o *T. gondii* proveniente de um caso humano. A caracterização da doença atingindo adultos foi documentada por PINKERTON & WEINMAN (1940). Em 1941, SABIN assinalou a presença do *T. gondii* como agente etiológico da encefalite em crianças; a toxoplasmose ganglionar em humanos só foi reconhecida por SIIM em

1952.

Com o advento de testes intradérmicos e sorológicos, em especial o teste do corante (SABIN & FELDMAN, 1948), pôde-se ter idéia da prevalência do *T. gondii* em humanos e animais. Dessa forma, verificou-se que as infecções no ser humano geralmente são assintomáticas e que este protozoário está amplamente distribuído na natureza, afetando mamíferos e aves (FELDMAN, 1982).

2.2. Classificação

Até o presente momento, o Comitê da Sociedade de Protozoologistas em relação à Sistemática e Evolução (LEVINE et. al., 1980) tem situado o gênero *Toxoplasma* como pertencente ao filo Apicomplexa Levine, 1970; classe Sporozoa Leuckart, 1879; subclasse Coccidia Leuckart, 1879; ordem Eucoccidia Léger & Duboscq, 1910; subordem Eimeriina Léger, 1911.

LEVINE (1973a) classificou o gênero *Toxoplasma* em uma família isolada Toxoplasmatidae Biocca, 1956 e, posteriormente, (LEVINE, 1973b) na família Sarcocystidae Poche, 1913. FRENKEL (1974) situou-o novamente na família Toxoplasmatidae. No entanto, FRENKEL (1977) reconsiderou, reconhecendo-o como pertencente à subfamília Toxoplasmatinae Biocca, 1965 na família Sarcocystidae.

Em 1977, LEVINE, após revisão das principais características do *Toxoplasma*, descreveu-o como um gênero da família Eimeriidae Minchin, 1903, onde também propôs 7 espécies de *To-*

xoplasma, sendo *T. gondii* e *T. hammondii* (syn. *Hammondia hammondii*, FRENKEL & DUBEY, 1975) as únicas espécies cujos ciclos de vida foram estudados. As outras cinco espécies propostas (*T. alencari*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. ranae* e *T. serpai*) têm sido encontradas em répteis e anfíbios, porém, consideradas por DUBEY (1977) como espécies de posição taxonômica incerta, devido ao desconhecimento de suas estruturas celulares e ciclos biológicos.

2.3. Aspectos biológicos

O *T. gondii* é um parasita homoxeno ou heteroxeno. Seu ciclo biológico completo só pode ser observado no hospedeiro definitivo, ou seja, em um felídeo. Contudo, cerca de 200 espécies de animais entre mamíferos e aves podem ser considerados hospedeiros intermediários (LEVINE, 1977).

Os três estádios infectantes deste protozoário são: os taquizoítas (formas de multiplicação rápida, também chamadas trofozoítas ou endozoítas), os bradizoítas (formas de multiplicação lenta, também conhecidas como cistozoítas) em cistos teciduais e os esporozoítas em oocistos esporulados (DUBEY, 1986c).

À exceção da esporulação que acontece no meio ambiente, observa-se no ciclo de vida do *T. gondii*, a presença de dois ciclos distintos: um ciclo "enteroepitelial", que ocorre em felinos, levando à formação de gametas e oocistos, e um ciclo "extra-intestinal ou tecidual", que ocorre nos hospedeiros intermediários e também em felinos (FRENKEL, 1973).

2.3.1. Ciclo "Enteroepitelial"

DUBEY & FRENKEL (1972) realizaram minucioso estudo sobre o ciclo do *T. gondii* em gatos, após a inoculação oral de cistos. Embora o ciclo assexuado no epitélio intestinal do gato possa ser iniciado através de taquizoítas e esporozoítas, somente o ciclo induzido com bradizoítas tem sido melhor estudado. Estes mesmos autores associaram ao ciclo "enteroepitelial" cinco novas fases de multiplicação, denominadas como "tipos" A, B, C, D e E. O conceito de um "tipo" baseia-se na sua estrutura, no seu tempo limitado de ocorrência no intestino do gato e no seu modo de divisão. A gametogonia, com conseqüente formação de oocistos, foi também estudada. A origem dos gametócitos não foi determinada, provavelmente os merozoítas, provenientes dos merontes tipos D e E, sejam os responsáveis por ela.

Posteriormente, DUBEY (1979) conseguiu demonstrar novamente as fases acima citadas, utilizando, além da cepa do primeiro estudo, uma outra cepa do *T. gondii*. Este autor, propôs que estudos *in vitro* sejam realizados, utilizando cultura de epitélio intestinal de felídeo infectada com *T. gondii* para completo esclarecimento dos estádios evolutivos.

Os períodos pré-patentes e patentes variam dependendo da forma infectante adquirida pelo hospedeiro definitivo (DUBEY et al., 1970a; WALLACE, 1973a). Assim sendo, o período pré-patente após a ingestão de cistos contendo bradizoítas foi de 4 a 5 dias, após a ingestão de taquizoítas foi de 5 a 19 dias e após a ingestão de oocistos esporulados foi de 21 a 49 dias.

Os respectivos períodos de patência após a ingestão das estruturas referidas foram: 9 a 20 dias, 2 a 12 dias e 5 a 8 dias (WALLACE, 1973a).

Observações de campo e dados experimentais sugerem que, apesar da possibilidade do gato se infectar e completar o ciclo a partir da ingestão de oocistos, o modo de transmissão ao gato, com a participação de hospedeiros intermediários, contendo taquizoítas ou bradizoítas, pode ser o mais comum na natureza (WALLACE, 1973a e 1973b).

2.3.2. Ciclo "Extra-Intestinal"

No ciclo completo nos hospedeiros não-felídeos desenvolvem-se inicialmente taquizoítas, que possuem a capacidade de parasitar vários tipos celulares como fibroblastos, células reticulares, hepatócitos, pneumócitos, neurônios e células do músculo cardíaco; estas formas são observadas durante a infecção aguda (FRENKEL, 1973). MANWELL (1941) e WOLFSON (1941) demonstraram o *T. gondii* em eritrócito de aves. Entretanto, os cistos são observados na infecção crônica, comumente no cérebro, coração e músculo esquelético, podendo, no entanto, aparecer em qualquer órgão (FRENKEL, 1973).

A parede dos cistos isola os bradizoítas dos tecidos do hospedeiro, impedindo a reação inflamatória (FRENKEL, 1956). Desta maneira, os cistos intactos provavelmente não causam nenhum prejuízo ao hospedeiro, podendo persistir por toda a vida (DUBEY, 1977).

O ciclo extra-intestinal também ocorre no gato, simultaneamente ao ciclo que se passa no intestino. Assim, os tecidos extra-intestinais do gato podem ser parasitados por taquizoítas e mais tarde por cistos (DUBEY & FRENKEL, 1972).

2.3.3. Esporulação

Os oocistos são as formas eliminadas nas fezes dos felídeos (FRENKEL et al., 1970; DUBEY et al., 1970b, MILLER et al., 1972), ainda imaturos e não infectantes. A esporulação ocorre dentro de um período de 1 a 4 dias, a temperatura ambiente e sob condições aeróbicas. Dentro de cada oocisto infectante formam-se 2 esporocistos, cada qual contendo 4 esporozoítas (DUBEY et al., 1970c). Adicionalmente, DUBEY & FRENKEL (1973) observaram que, em camundongos experimentalmente infectados com oocistos esporulados, alguns desses passaram através do intestino sem que ocorresse a excistação e deste modo eram eliminados nas fezes ainda infectantes.

2.4. Aspectos morfológicos

O taquizoíta do *T. gondii* mede cerca de 2 x 6 um e geralmente possuía forma de meia-lua, com a extremidade anterior afilada e a extremidade posterior arredondada, estando o núcleo situado usualmente próximo à extremidade posterior ou centralmente. O taquizoíta torna-se ovóide após a penetração na célula do hospedeiro e esta isola-o, através da formação de um

vacúolo parasitóforo (DUBEY, 1977).

Com o auxílio da microscopia eletrônica pôde-se verificar na estrutura dos taquizoítas do *T. gondii* a presença de uma película, anel polar, conóide, roptrias, micronemas, mitocôndrias, microtúbulos subpeliculares, retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi, microporo, ribossomas e um núcleo bem definido (SCHOLTYSECK & PIEKARSKI, 1965; SHEFFIELD & MELTON, 1968).

Pseudocistos, grupos, clones ou colônias terminais, são denominações dadas à célula hospedeira contendo numerosos taquizoítas (DUBEY, 1977).

O cisto é constituído por uma membrana argirofílica que envolve vários bradizoítas, geralmente são subesféricos ou tomam a forma da célula hospedeira. O tamanho dos cistos é variável; os jovens podem medir 5 um, possuindo somente 4 bradizoítas; enquanto, os cistos mais velhos podem ter um diâmetro de até 100 um e conter centenas de organismos. Estruturalmente, os bradizoítas diferem pouco dos taquizoítas; os primeiros geralmente possuem o núcleo situado perto da extremidade posterior, enquanto, nos taquizoítas, o núcleo é visto mais centralmente (DUBEY, 1977). Entretanto, DUBEY & FRENKEL (1976) observaram que, durante a divisão, tanto os taquizoítas como os bradizoítas, apresentaram o núcleo localizado centralmente. Os bradizoítas contêm vários grânulos de glicogênio, os quais são raros ou ausentes nos taquizoítas (DUBEY, 1977).

Os oocistos não esporulados são subesféricos a esféricos e medem cerca de 10 x 12 um; enquanto que os oocistos es-

porulados são subesféricos a elipsoidais, medindo cerca de 11 x 12,5 um (DUBEY et al., 1970a; DUBEY 1973 e 1976). Os esporocistos são elipsoidais, medindo cerca de 6 x 8,5 um e os esporozoítas são alongados, curvando-se dentro de cada esporocisto e medindo cerca de 2 x 8 um quando livres (DUBEY et al., 1970a).

2.5. Resistência das formas infectantes

A dessecação, o etanol a 70% e os desinfetantes comumente usados, eliminam facilmente os taquizoítas. Os cistos são destruídos quando se cozinha a carne a temperaturas superiores a 60°C; já o congelamento não é um método tão eficiente para a eliminação dos cistos (FRENKEL, 1973). DUBEY (1974) verificou que os cistos tornavam-se não infectantes após o congelamento a -20°C por 4 horas ou mais, embora já se tenha assinalado a sobrevivência de cistos ao congelamento, como ocorrido com a cepa Aldrin que foi recuperada do cérebro e da musculatura após o congelamento a -20°C por 16 dias (DUBEY & FRENKEL, 1973). Os bradizoítas presentes nos cistos são muito mais resistentes à digestão enzimática do que os taquizoítas (JACOBS et al., 1960).

Os oocistos são altamente resistentes e podem permanecer infectantes por mais de um ano (YILMAZ & HOPKINS, 1972; FRENKEL et al., 1975). São resistentes aos ácidos e álcalis e à maior parte dos desinfetantes. Porém, são sensíveis à amônia, à dessecação e à temperatura de 55°C por 30 minutos (DUBEY et al., 1970b).

2.6. Modos de transmissão

Os três principais modos de transmissão do *T. gondii* são: a transmissão congênita (transplacentária), a transmissão pelo carnivorismo e a transmissão fecal-oral (DUBEY, 1986d).

A transmissão transplacentária humana foi a primeira a ser reconhecida (WOLF & COWEN, 1937). Posteriormente, esta foi observada por BEVERLEY (1959) ocorrendo em sucessivas gerações de camundongos.

A descoberta por JACOBS et al. (1960) de que os cistos possuíam organismos mais resistentes à digestão péptica do que os taquizoítas, deu suporte à hipótese, já existente na época, da transmissão através do carnivorismo. Esta, então, pôde ser demonstrada quando DESMONTS et al. (1965) compararam as taxas de infecção por *Toxoplasma* em crianças, antes e após serem internadas em um hospital, onde carne crua era utilizada terapêuticamente.

A transmissão fecal, que explica a infecção de herbívoros e vegetarianos, começou a ser esclarecida a partir das observações de HUTCHISON (1965), que demonstrou infectividade nas fezes de um gato, o qual havia ingerido camundongos cronicamente infectados com o *T. gondii*. Inicialmente foi proposto que o *T. gondii*, nas fezes do gato, estaria protegido dentro dos ovos do *Toxocara cati* e, assim, este nematóide o transmitiria (HUTCHISON, 1967). No entanto, a hipótese desta associação mostrou-se ser apenas circunstancial (FRENKEL et al., 1969). Em 1970, diversos autores demonstraram a presença de oocistos de

T. gondii nas fezes de gato, caracterizando assim, este protozoário como um coccídeo (FRENKEL et al., 1970; HUTCHISON et al., 1970; SHEFFIELD & MELTON, 1970; WEILAND & KÜHN, 1970).

Apesar de bem menos provável, existe ainda a possibilidade do *Toxoplasma* ser transmitido através da ingestão de leite não pasteurizado, da ingestão de ovos, de transfusão de sangue, de transplantes de órgãos e de acidentes de laboratório (FRENKEL, 1973).

O crescente consumo de leite de cabras, principalmente para crianças, pode ter alguma importância em saúde pública, já que este leite geralmente é consumido sem pasteurização (DUBEY et al., 1980; DUBEY, 1986d) .

Com relação à participação de hospedeiros-transporte na transmissão do *T. gondii*, tem-se demonstrado experimentalmente que moscas (WALLACE, 1971), baratas (WALLACE, 1972 e 1973b; CHINCHILLA & RUIZ, 1976) e minhocas (FRENKEL et al., 1975) foram capazes de transportar oocistos deste protozoário. Além disso, certas espécies de aves que servem como hospedeiros intermediários do *T. gondii* alimentam-se de minhocas (MARKUS, 1974) e estas por sua vez facilitam a disseminação dos oocistos pelo solo (RUIZ & FRENKEL, 1980).

2.7. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial faz-se necessário para confirmação definitiva da toxoplasmose, uma vez que esta doença apresenta uma sintomatologia não específica, podendo ser confundida com várias outras enfermidades. Além disso, a infecção pode ser oligossintomática ou ainda assintomática.

O isolamento do *T. gondii* em animais de laboratório é um método seletivo, sendo o camundongo albino, o animal de escolha, devido a sua alta susceptibilidade à infecção pelo *T. gondii* (KAMEI et al., 1976).

O teste da intradermoreação (FRENKEL, 1948) é de pouco valor no diagnóstico de casos individuais, mas pode ser útil em inquéritos epidemiológicos e no diagnóstico de casos de toxoplasmose crônica (SIIM et al., 1963).

O teste do corante de SABIN & FELDMAN (1948) ainda hoje merece destaque, principalmente por ser um dos testes mais específicos para a toxoplasmose. Entretanto, há a necessidade de se utilizar o parasito vivo (DUBEY, 1977).

Os testes de fixação de complemento, de hemaglutinação indireta, de imunofluorescência indireta, entre outros, e mais recentemente, provas imunoenzimáticas, auxiliam não só no diagnóstico da toxoplasmose (APT, 1988), mas permitem também que levantamentos epidemiológicos sejam realizados (SOUZA,

1986).

Recentemente, DUBEY & THULLIEZ (1989) obtiveram resultados satisfatórios para o diagnóstico sorológico de toxoplasmose em gatos, utilizando o teste de aglutinação. Anticorpos IgA contra o antígeno P-30 do *T. gondii*, em testes imunoenzimáticos, têm sido usados como marcadores para o diagnóstico da toxoplasmose humana congênita e aguda (DECOSTER et al., 1988).

O resultado de um soro com títulos baixos de anticorpos pode indicar apenas uma infecção toxoplásmica passada; às vezes, é necessário novo exame para que o diagnóstico de uma infecção aguda seja confirmado ou descartado. Neste último caso, o título de anticorpos permanece estável. Igualmente, encontra-se certa dificuldade na avaliação sorológica com relação à toxoplasmose ocular, na qual, mesmo um baixo título de anticorpos anti-*Toxoplasma* não exclui a possibilidade de retinocoroidite em atividade (DUBEY, 1977).

Atenção especial deve ser dada a resultados negativos em exames sorológicos de gatos, já que, durante o período de eliminação de oocistos, os gatos, geralmente, não costumam desenvolver anticorpos (DUBEY & FRENKEL, 1972).

O diagnóstico também pode ser realizado através da visualização do parasito, com estruturas típicas, em impressões de órgãos coradas pelo Giemsa (DUBEY, 1977).

BEVERLEY (1976) estudando as alterações histológicas causadas pelo *T. gondii* em animais, relata que apesar das lesões serem bastante sugestivas, o diagnóstico definitivo de toxoplasmose somente poderá ser feito com a visualização do parasito nos tecidos. No exame histológico, os cistos, quando corados pela hematoxilina-eosina, podem ser facilmente vistos. Os grânulos de glicogênio dos bradizoítas coram-se fortemente com o ácido periódico de Schiff (PAS), enquanto que a membrana dos cistos cora-se bem pela prata. Ao contrário dos cistos, os taquizoítas não têm propriedades tintoriais específicas, sendo mais difíceis de serem visualizados (DUBEY, 1977).

Atualmente, através da técnica de peroxidase anti-peroxidase, é possível visualizar-se o *T. gondii* e seus resíduos antigênicos em cortes histológicos fixados em formalina. Esta técnica apresenta uma positividade bem maior do que a obtida em cortes histológicos corados através da hematoxilina-eosina, podendo-se reconhecer o parasito mesmo em tecidos em decomposição (UGGLA et al., 1987; GUSTAFSSON et al., 1988).

2.8. Toxoplasmose no homem e nos animais domésticos

As manifestações clínicas da toxoplasmose no homem podem ser resultado de uma infecção congênita ou adquirida.

De acordo com BEVERLEY (1974), a infecção congênita somente ocorre quando a mulher se infecta pela primeira vez durante a gravidez. Neste caso, poderá ocorrer aborto ou le-

sões no feto, tais como retinocoroidite, hidrocefalia e calcificação intracerebral. Por outro lado, a linfadenopatia constitui a manifestação clínica mais comum na toxoplasmose adquirida, podendo ocorrer complicações ocasionais por envolvimento de outros órgãos como pulmão, coração, fígado, musculatura esquelética ou cérebro (BEVERLEY, 1974).

A imunossupressão é um fator importante especialmente quando se trata de toxoplasmose. Pacientes com linfomas, síndrome de imunodeficiência adquirida ou aqueles sujeitos a transplantes de órgãos ou sujeitos à quimioterapia imunossupressora podem manifestar infecção aguda, sendo que esta, geralmente, afeta o sistema nervoso central (FELDMAN, 1982; FRENKEL, 1986).

Em diversos países, o *T. gondii* tem sido a causa de abortos, mumificação, natimortos e morte neonatal em ovinos (BLEWETT & WATSON, 1984; DUBEY et al., 1986b). O sistema reprodutivo das cabras também pode ser afetado pelo *T. gondii*, acarretando os mesmos distúrbios que ocorrem nos ovinos (NURSE & LENGHAUS, 1986). Tanto ovelhas (DUBEY et al., 1986b), como cabras (DUBEY et al., 1986a), apresentam lesões necróticas nos cotilédones da placenta, características da toxoplasmose. O reconhecimento desta lesão é importante no diagnóstico de aborto nestas espécies, já que o *T. gondii* é difícil de ser observado entre as células degeneradas do hospedeiro (DUBEY, 1987), sendo, às vezes, necessário o emprego de técnicas especiais para visualizá-lo (UGGLA et al., 1987).

Em bovinos, provavelmente, o *T. gondii* não represente

um agente causador de abortos ou doença clínica (DUBEY, 1986b).

A infecção pós-natal parece ser a mais comum na espécie suína e geralmente se manifesta subcl clinicamente. Casos esporádicos de toxoplasmose fatal em leitões têm sido reportados (DUBEY, 1986a).

Entre os cães, a toxoplasmose é mais severa em animais jovens (DUBEY, 1977). CAMPBELL et al. (1955) descreveram associação do *T. gondii* com o vírus da cinomose.

Nos gatos, a toxoplasmose congênita, apesar de rara, já foi confirmada (DUBEY & JOHNSTONE, 1982). A toxoplasmose clínica nestes animais é também de baixa ocorrência (DUBEY, 1986c), apresentando-se a pneumonia como a mais importante alteração (MEIER et al., 1957). Embora o parasito se multiplique no intestino desses animais, raramente observa-se diarreia (DUBEY, 1977).

Organismos semelhantes ao *T. gondii* têm sido observados em equinos com encefalomielite (CUSICK et al., 1974; DUBEY et al., 1974; DORR et al., 1984). No entanto, devido às diferenças estruturais e ao fato de não se ter isolado o protozoário de tecidos dos equinos afetados, este organismo parece ser outro protozoário que não o *T. gondii* (DUBEY et al., 1974).

2.9. Toxoplasmose em galinhas

2.9.1. Ocorrência da doença

A primeira descrição da toxoplasmose espontânea em galinhas foi feita na Alemanha, por HEPDING (1939), em uma gali-

nha com neurolinfomatose e retinocoroidite "necrotizante"; o parasito foi encontrado no exame histológico da retina. SPARANANI (1950), na Itália, descreve uma doença em galinhas com algumas evidências de ter sido ocasionada pelo *T. gondii*. Na Suíça, FANKAUSER (1951) relata um caso de uma galinha que apresentou lesão cerebral pelo *T. gondii*, com grande número de parasitos livres e intracelulares. BORN (1951), na Alemanha, suspeitando de um possível envolvimento de galinhas na infecção do homem por *Toxoplasma*, encontrou positividade nas diluições de 1:25 e 1:100, em duas de três galinhas por ele pesquisadas, utilizando o teste do corante. SCHULTE (1954), também na Alemanha, observou encefalite por *Toxoplasma* em galinhas.

O primeiro isolamento do *T. gondii* de casos espontâneos em galinhas foi realizado na Noruega, por ERICHSEN & HARBOE (1953) em um surto envolvendo uma pequena criação de galinhas White Leghorn. Logo a seguir, NOBREGA et al. (1954), em nota prévia, descreveram, no Brasil, uma epizootia de toxoplasmose afetando 600 frangos New-Hampshire, de 2-3 meses de idade. Em 1955, NOBREGA et al. descreveram este surto detalhadamente, sendo que a mortalidade nos animais foi de 50%.

Na Dinamarca, BIERING-SORENSEN (1956), baseando-se na morfologia, demonstrou a presença do *T. gondii* em 35 galinhas provenientes de 21 criações. Em 6 destas criações, o parasito foi detectado sorologicamente e/ou por inoculação de órgãos das aves em camundongos, por via intraperitoneal. GIBSON & EYLES (1957) conseguiram isolar o *T. gondii* do cérebro de diversos animais, inclusive de 3 de 7 galinhas pesquisadas nas proximi-

dades de uma residência, onde havia ocorrido um caso humano de toxoplasmose congênita. Na Iugoslávia, SIMITCH et al. (1961a) isolaram 2 cepas de *T. gondii* de 786 galinhas examinadas.

Alguns autores encontraram, com certa freqüência, o *T. gondii* parasitando os ovários e os ovidutos de galinhas naturalmente infectadas (BIERING-SORENSEN, 1956; JACOBS et al., 1962).

FOSTER et al. (1969) observaram que em galinhas infectadas espontaneamente, o cérebro, o coração e o ovário-oviduto foram os órgãos dos quais mais frequentemente se obteve o isolamento do *T. gondii*, ratificando os achados de McCULLOCH et al. (1966) (citados por FOSTER et al., 1969).

2.9.2. Toxoplasmose experimental

Diversos autores demonstraram a infecção experimental em galinhas. CARINI (1909) foi o primeiro a inocular galinhas com *Toxoplasma*, com a cepa de coelho obtida por SPLENDORE (1908). Posteriormente, cepas de *Toxoplasma*, isoladas de diversos hospedeiros, foram inoculadas, por diferentes vias, em galinhas de várias faixas etárias (LAVERAN & MARULLAZ, 1913; LEVADITI et al., 1929; WOLF et al., 1940; NOBREGA & REIS, 1942; MANWELL et al., 1945; RUCHMAN & JOHNSMANN, 1948; JACOBS & JONES, 1950; MANWELL & DROBECK, 1951; GEISSLER, 1952). Nos experimentos realizados por estes autores, verificou-se uma diferença de sensibilidade conforme a idade da ave e a via de inoculação empregada. Desta maneira, a maioria das cepas, quando inoculadas por via intracerebral em aves com menos de duas semanas de idade, geral-

mente, causava a morte das aves. Mesmo quando utilizada outra via de inoculação, as aves desta faixa etária, por vezes, morriam. Alguns animais adultos apresentavam paralisia após inoculação intracerebral; todavia, não apresentavam sintomas clínicos, quando outras vias de inoculação eram utilizadas. Apenas GEISSLER (1952) descreveu desenvolvimento de sintomas nervosos e morte de aves adultas, após inoculação intraperitoneal.

Através das vias intraperitoneal, oral e cloacal, GEISSLER (1955) infectou galinhas empregando cepas procedentes de um caso de toxoplasmose de uma criança (cepa "BK") e de um leitão (cepa "UH"), verificando que as aves mais jovens apresentavam sintomas e lesões mais pronunciados.

SIMITCH et al. (1961b) inoculando, por via oral, galinhas de diversas idades com taquizoítas e cistos de cepas consideradas como de baixa virulência, verificaram sintomas de toxoplasmose somente com as formas císticas do *T. gondii*, sendo estes observados em 71,4% das aves de 1 dia e 40% das aves de 3 dias; as aves de 24 dias e de 82 dias foram resistentes.

KULASIRI (1965), revisando a literatura, constatou que a maioria dos autores, em seus experimentos, utilizou cepas do *T. gondii* virulentas que, ao serem inoculadas por via intracerebral em galinhas, apresentaram um comportamento anômalo, matando as aves rapidamente.

Acerca da parasitemia nas galinhas, estudos foram realizados por JACOBS & JONES (1950); HARBOE & ERICHSEN (1955); JONES et al. (1959); KINJO (1961) e JACOBS & MELTON (1966). Todos esses autores observaram que a parasitemia aparecia rapidamen-

te, mas que, apenas ocasionalmente, persistia por mais de 2 semanas, mesmo quando se empregavam inóculos variando de 10^5 a 10^8 taquizoítas de *T. gondii*.

HARBOE & ERICHSEN (1954) compararam duas cepas do *Toxoplasma*, inoculando-as em galinhas. Uma das cepas (cepa "Ch") foi isolada de um surto ocorrido em galinhas (ERICHSEN & HARBOE, 1953); a outra (cepa R-H), era procedente de um caso humano (SABIN, 1941). Os achados anátomo-patológicos encontrados foram duvidosos, sendo que nenhuma das galinhas apresentou uma doença sistêmica semelhante àquela encontrada nas aves naturalmente infectadas. Para aves de um dia, a cepa "Ch" pareceu ter virulência um pouco mais acentuada do que a cepa RH. Em relação às aves adultas, nenhuma diferença entre as duas cepas pôde ser constatada.

NOBREGA et al. (1955) também não obtiveram sucesso quando tentaram reproduzir, em frangos, a doença ocorrida espontaneamente.

Não foi verificado nenhum efeito em relação à susceptibilidade e à distribuição do parasito em experimentos com galinhas deficientes em vitaminas (JONES et al., 1959; KULASIRI & PRASAD, 1961). Da mesma forma, nenhum resultado foi conseguido quando tentaram modificar a susceptibilidade das aves através de inoculação com cortisona (JONES et al., 1959).

BICKFORD & SAUNDERS (1966) discutiram sobre a possibilidade do *T. gondii* estar associado com outros agentes etiológicos para produzir doença grave em galinhas.

HARBOE & ERICHSEN (1955) estudaram a resposta imunoló-

gica de galinhas à infecção experimental com *Toxoplasma*.

JONES et al. (1959) observaram que o *T. gondii* desaparecia dos tecidos das galinhas, inclusive dos músculos, em cerca de 4 semanas pós-infecção.

Apesar de demonstrar a tendência que as galinhas têm de eliminarem o *T. gondii* de seus tecidos infectados, KINJO (1961) observou que, em alguns casos, o mesmo permaneceu por períodos relativamente longos sem causar sintomas aparentes. Este autor também responsabiliza a idade das aves como um importante fator de influência na susceptibilidade das galinhas ao *T. gondii*.

Os trabalhos de KULASIRI & PRASAD (1961) e KULASIRI (1965), utilizando cepas avirulentas do *Toxoplasma* mostraram que os parasitas permaneceram no cérebro das galinhas por até um mês. Baseando-se também em dados experimentais, JACOBS & MELTON (1966) e BICKFORD & SAUNDERS (1966) constataram a presença de *T. gondii* nos tecidos de galinhas, por períodos prolongados.

Após inocularem galinhas por via intraperitoneal, oral e subcutânea, BOCH et al. (1966) conseguiram isolar o *T. gondii* com maior frequência do cérebro (91%) e do coração (79%). BIANCIFIORI et al. (1986), apesar de terem isolado o *T. gondii* de vários órgãos de galinhas infectadas com oocistos, 7 a 15 dias pós-inoculação, quando tentaram o isolamento 40 dias pós-inoculação, este só foi possível do cérebro e do coração.

2.9.3. Sintomatologia e lesões

2.9.3.1. Infecção natural

No surto descrito por ERICHSEN & HARBOE (1953), a doença apresentava-se de evolução variável, algumas aves morriam sem qualquer sintomatologia, outras, todavia, ficavam até um mês doentes. Os sintomas não foram característicos, exceto cegueira ocasional. No exame histológico, o *T. gondii* foi encontrado no coração, cérebro, pulmão, fígado, pró-ventrículo e no intestino delgado. As lesões associadas com a presença do parasito foram pericardite serosa, miocardite focal ou difusa, encefalite focal "necrotizante", hepatite "necrotizante", pneumonia "necrotizante" e gastroenterite ulcerativa. Um três casos, observou-se coroidite difusa, mas sem a presença do protozoário.

NOBREGA et al. (1955) relataram uma evolução de 4-5 dias. Os sintomas de tristeza, arrepiamento, asas caídas, olhos fechados e fezes esbranquiçadas também não foram considerados característicos. Conjuntivite unilateral intensa, não associada à presença do parasito, foi observada em um frango. Os achados de necropsia mais importantes foram fígado e baço aumentados de volume, os quais apresentavam nódulos branco-amarelados variáveis em número e tamanho e pulmão com extensas áreas de congestão e consolidação. Ao exame histológico observaram pneumonia associada à presença de *Toxoplasma* no interior de células mononucleares; pericardite e miocardite com moderada quantidade de parasitas entre as fibras e lesões necrótico-inflamató-

rias no fígado e no baço, com os parasitas apresentando-se isolados ou em grupos. Foi possível o isolamento do *T. gondii* do fígado, baço e pulmão. No cérebro não foram observadas lesões, com exceção de um caso com focos de necrose sem reação inflamatória. Histologicamente, também não foi possível visualizar o parasito. Entretanto, pôde-se isolar o mesmo do cérebro de dois animais mortos após a fase aguda da doença e, igualmente, do cérebro de 23 animais sobreviventes, 4 a 6 meses após o surto.

BIERING-SORENSEN (1956) considerou a necrose do quiasma óptico como sendo uma lesão característica de toxoplasmose em galinhas.

SIIM et al. (1963) descreveram aspectos clínicos e patológicos da toxoplasmose em galinhas. Os casos clínicos, geralmente fatais, são caracterizados por sintomas nervosos. Estes autores, dividiram a toxoplasmose em galinhas, com base nos achados anátomo-patológicos encontrados, em duas formas: a forma cerebral (ocular) e a forma visceral. Ao exame macroscópico, a primeira apresenta caracteristicamente uma necrose basal do mesencéfalo, sem a visualização de alterações em outros órgãos. Retinocoroidite é comumente observada. Entretanto, as lesões nos outros locais só podem ser vistas microscopicamente. Já na forma visceral, as alterações nas vísceras são visíveis macroscopicamente; o sistema nervoso central também pode estar afetado, porém as lesões somente são observadas ao microscópio.

2.3.9.2. Infecção experimental

HARBOE & ERICHSEN (1954), inoculando galinhas de diferentes idades através de diversas vias (intradérmica e/ou subcutânea, intraperitoneal, intracerebral e intravenosa) verificaram que várias aves não mostraram sintomas nem lesões. As únicas alterações encontradas foram: infiltrados perivascularres no cérebro de algumas aves inoculadas pelas diversas vias; reação inflamatória no local da inoculação intradérmica; pneumonite "necrotizante" acompanhada ou não da presença do parasito em algumas aves, após inoculação subcutânea; e necrose focal do fígado em duas galinhas, uma inoculada por via subcutânea e outra inoculada por via intraperitoneal.

Nas galinhas inoculadas por GEISSLER (1955), a sintomatologia foi predominantemente nervosa e, à necropsia, observou-se discreta congestão do fígado, pequenos infartos no fígado e baço e enterite hemorrágica.

BICKFORD & SAUNDERS (1966) inocularam 3 grupos de pintos de 1 dia. O grupo I foi inoculado por via intracranial, o grupo II por via intracranial e intramuscular e o grupo III por via intramuscular. Sintomas nervosos, com rápida evolução para morte, foram vistos em mais de 50% das galinhas, nos dois primeiros grupos; meningoencefalite grave acompanhada da presença do *T. gondii* e necrose focal do fígado foram observadas nestas aves. As aves sobreviventes destes dois grupos (I e II) não mostraram sintomas durante 3 meses, no entanto, pôde-se verificar lesões no cérebro e no fígado e o *T. gondii* foi

visualizado no cérebro dessas aves. As aves do grupo III não mostraram sintomatologia, mas apresentaram lesões quando examinadas 3 meses após a inoculação. Lesões no coração foram observadas macroscopicamente em algumas aves. Histologicamente, foram observadas lesões no cérebro, coração, fígado, pâncreas e testículos. No cérebro, o *T. gondii* foi visto na maioria dos casos; no miocárdio, pâncreas e testículo foi observado em apenas algumas aves e no fígado estava ausente. A infiltração celular nos testículos, associada a grande número de parasitas, foi acentuada, restando apenas poucos túbulos seminíferos degenerados.

Morte dos embriões e mal formações congênicas foram observadas após a inoculação de *T. gondii* em galinhas poedeiras (CABALLERO-SERVÍN, 1974).

2.9.4. Diagnóstico laboratorial

Vários foram os autores que realizaram investigações sorológicas em galinhas, seja com aves infectadas espontaneamente ou experimentalmente. A maioria deles utilizou o teste do corante de SABIN & FELDMAN e/ou o teste de fixação de complemento.

Com o teste de SABIN & FELDMAN, os resultados foram negativos ou positivos em baixas diluições (ERICHSEN & HARBOE, 1953; VOLLBRECHTSHAUSEN, 1954; NOBREGA et al., 1955; BIERING & SORENSEN, 1956; JONES et al., 1959; BICKFORD & SAUNDERS, 1966; FOSTER et al., 1969; MILLER et al., 1972).

Ao contrário do observado normalmente no soro de outros animais com toxoplasmose, soros de galinhas infectadas, naturalmente ou experimentalmente, não reagiram no teste de fixação do complemento (ERICHSEN & HARBOE, 1955; NOBREGA et al., 1955; BIERING-SORENSEN, 1956). Por outro lado, HARBOE & REENAS (1957) demonstraram, em galinhas com toxoplasmose, a existência de anticorpos específicos, mas incapazes de formar um complexo antígeno-anticorpo, com atividade de fixar o complemento. Observaram que o soro de galinhas infectadas experimentalmente foi positivo no teste de inibição da fixação de complemento, enquanto no teste de corante e no teste de fixação do complemento foram negativos.

Os resultados obtidos por BOCH et al. (1966) com o teste de imunofluorescência assim como os obtidos por FRENKEL (1981), com o teste de hemaglutinação indireta, não foram satisfatórios.

Recentemente, com o teste de ELISA-IgG, BIANCIFIORI et al. (1986) obtiveram resultados positivos em galinhas inoculadas com oocistos esporulados do *Toxoplasma*.

O diagnóstico através de soro-conversão em camundongos ou pela identificação do parasito em esfregaços ou exame histológico em camundongos inoculados com suspensão de tecidos das aves suspeitas têm sido os métodos indiretos mais eficazes na verificação da toxoplasmose em galinhas, já que os testes sorológicos convencionais não são indicadores sensíveis e até certo ponto confiáveis quando se trata de aves, podendo levar à falsas conclusões (FRENKEL, 1981). Este fato é exemplificado no es-

tudo epidemiológico realizado em Costa Rica por RUIZ & FRENKEL (1980), no qual foi possível isolar-se o *T. gondii* de 54% das galinhas estudadas, sendo que os soros de todas estas aves apresentaram-se negativos ao teste do corante.

2.9.5. Importância das galinhas como hospedeiros intermediários

Como anteriormente citado, surtos de toxoplasmose foram relatados em diversos países, entretanto, a toxoplasmose em galinhas parece ser de rara manifestação clínica (BICKFORD & SAUNDERS, 1966). Por outro lado, isso não exclui a possibilidade delas abrigarem o parasito, já que tem sido reportada a persistência do mesmo em galinhas aparentemente saudáveis (FOSTER et al., 1969).

Alguns autores aventam a possibilidade de que ovos de galinhas possam ser infectantes (SPARAPANI, 1950; GEISSLER, 1955; KINJO, 1961). JONES et al. (1959) consideram apenas como um achado ocasional a presença do *Toxoplasma* em ovos de galinhas.

BIANCIFIORI et al. (1986) não conseguiram isolar o parasito de 720 ovos embrionados provenientes de galinhas inoculadas com oocistos infectantes. Da mesma forma, BOCH et al. (1966) após examinarem 2214 ovos provenientes de galinhas infectadas com taquizoítas e cistos, não conseguiram isolar o *T. gondii*.

RUIZ & FRENKEL (1980), em suas observações, verifica-

ram que os gatos domésticos não têm mostrado indícios de caçarem galinhas e desta forma, estas não desempenhariam nenhum papel natural na transmissão do *T. gondii*. Contudo, observaram que pessoas freqüentemente dão vísceras e cabeça de galinhas a gatos e cães; assim, sob estas circunstâncias, mesmo filhotes de gatos poderiam adquirir a infecção deste hospedeiro intermediário. Estes autores observaram ainda que a taxa de infecção em galinhas aumentava de 23% naquelas pesando menos de 500 g, para 73% naquelas entre 500 e 1000 g, indicando a rápida taxa de aquisição da infecção, provavelmente do solo, no qual as aves constantemente procuram pelo alimento. No solo, existe a possibilidade das galinhas se infectarem com oocistos esporulados de *T. gondii* e/ou através da ingestão de hospedeiros mecânicos destes oocistos.

2.10. Toxoplasmose em camundongos

A toxoplasmose em camundongos (*Mus musculus*) pode ser uma infecção aguda sintomática ou uma infecção crônica latente. Normalmente, as infecções agudas são sintomáticas nas duas primeiras semanas. A infecção crônica persiste, em geral, com a presença de cistos no cérebro (FRENKEL, 1975).

Os camundongos são os animais escolhidos para o cultivo do *Toxoplasma* em laboratório, devido à sua grande susceptibilidade e ao fato de não estarem naturalmente infectados, quando criados em laboratório com ração comercial livre de fezes de gato (DUBEY, 1977).

Estudos sobre a patogenicidade de cepas de *Toxoplasma* têm sido realizados em camundongos (DUBEY & FRENKEL, 1973; DUBEY, 1980). Algumas cepas são uniformemente fatais, mesmo em baixas doses, para os camundongos, enquanto outras não causam doença aparente (BEVERLEY, 1976). Utilizando-se cepas virulentas facilmente obtêm-se taquizoítas em camundongos, o que não ocorre com cepas avirulentas, as quais crescem lentamente, formando usualmente cistos cerebrais (DUBEY, 1977).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos animais

3.1.1. Origem das aves

Foi utilizado um total de vinte galinhas (*Gallus gallus*) que viviam livres, se alimentando ao solo, em contato com outros animais. Estas aves foram provenientes dos quilômetros 42, 47 e 49 da antiga estrada Rio-São Paulo, localizada no Distrito de Seropédica, Município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. As aves foram adquiridas aleatoriamente e de diversas criações.

Durante a aquisição das aves foi preenchida uma ficha, constando nesta, dados sobre o tipo de criação e de alimentação das aves, presença de gatos de estimação ou na vizinhança, presença de doença atual ou anterior na criação, número de aves na criação, condições habitacionais e dados adicionais.

3.1.2. Origem dos camundongos

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos jovens de ambos os sexos. Estes animais foram procedentes do Biotério Central do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ). Na Estação para Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, foram realizados os trabalhos de isolamento do *T. gondii* em camundongos. Estes últimos foram acondicionados em caixas plásticas com água e ração¹ *ad libitum*.

3.2. Parasitemia das aves

De cada ave, retirou-se sangue da veia ulnar (veia da asa) com seringa contendo anticoagulante (EDTA 11%). O sangue total, na quantidade de 1 ml, foi imediatamente inoculado subcutaneamente em cada dois camundongos, no sentido de se verificar, indiretamente, a parasitemia nas aves.

3.3. Necropsia das aves

As alterações macroscópicas, verificadas em cada necropsia, foram anotadas em fichas individuais. Posteriormente, realizou-se o exame do cérebro das aves e a coleta e processamento de órgãos para o isolamento.

¹ Purina, São Paulo.

3.3.1. Exame do cérebro

De cada ave foram realizados, a partir de pequenos fragmentos de cada hemisfério cerebral, exames a fresco entre lâmina e lamínula e esfregaços para a pesquisa de cistos. Os esfregaços foram secos ao ar, fixados com álcool metílico por 3 minutos e corados pelo Giemsa por 30 minutos.

3.3.2. Coleta e processamento de órgãos para o isolamento

Para o isolamento do *T. gondii* foram coletados fragmentos de cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim, ovário-oviduto e músculo peitoral. Os fragmentos foram colocados em placas de Petri e mantidos em geladeira a 4°C, até o momento do uso. Posteriormente, cada fragmento de órgão era isoladamente triturado em gral e pistilo estéreis, homogeneizados em 10 ml de solução salina a 0,9% e filtrados através de gaze estéril de 4 camadas.

3.4. Inoculação em camundongos

A suspensão de cada órgão, anteriormente citado, foi inoculada subcutaneamente em camundongos. Para cada sus-

² Solução de Cloreto de Sódio a 0,9%, Darrow Laboratórios. Rio de Janeiro.

pensão de órgão foram utilizados dois camundongos, sendo que cada animal recebeu 1 ml de inóculo.

Cada grupo de camundongos inoculados, num total de 18, correspondeu a uma galinha necropsiada. Dois outros camundongos foram utilizados, em cada grupo, como controles.

3.4.1. Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos camundongos

Cada animal foi observado durante um período de 30 dias pós-inoculação (DPI), anotando-se a sintomatologia e, em caso de morte neste período, foi realizada a necropsia e pesquisa do protozoário. Esta última foi feita através dos seguintes exames: exames a fresco e esfregaços de cérebro, conforme descritos no item 3.3.1., objetivando, principalmente, a pesquisa de cistos e impressões de pulmão, realizadas principalmente com objetivo de visualizarem-se taquizoítas do *T. gondii*. As impressões foram secas ao ar, fixadas com álcool metílico por 3 minutos e coradas pelo Giemsa por 30 minutos.

Todos os camundongos sobreviventes após o período de 30 DPI foram sacrificados, necropsiados e seus cérebros examinados para pesquisa de cistos do protozoário.

Para visualização do *T. gondii*, bem como das lesões sugestivas de toxoplasmose, fragmentos de cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rim dos camundongos que foram positivos em esfregaços e/ou impressões, foram coletados, fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados em mi-

crótomo 3 e corados pela hematoxilina-eosina (HE). Alguns cortes histológicos foram corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS).

3.5. Manutenção do *Toxoplasma gondii*

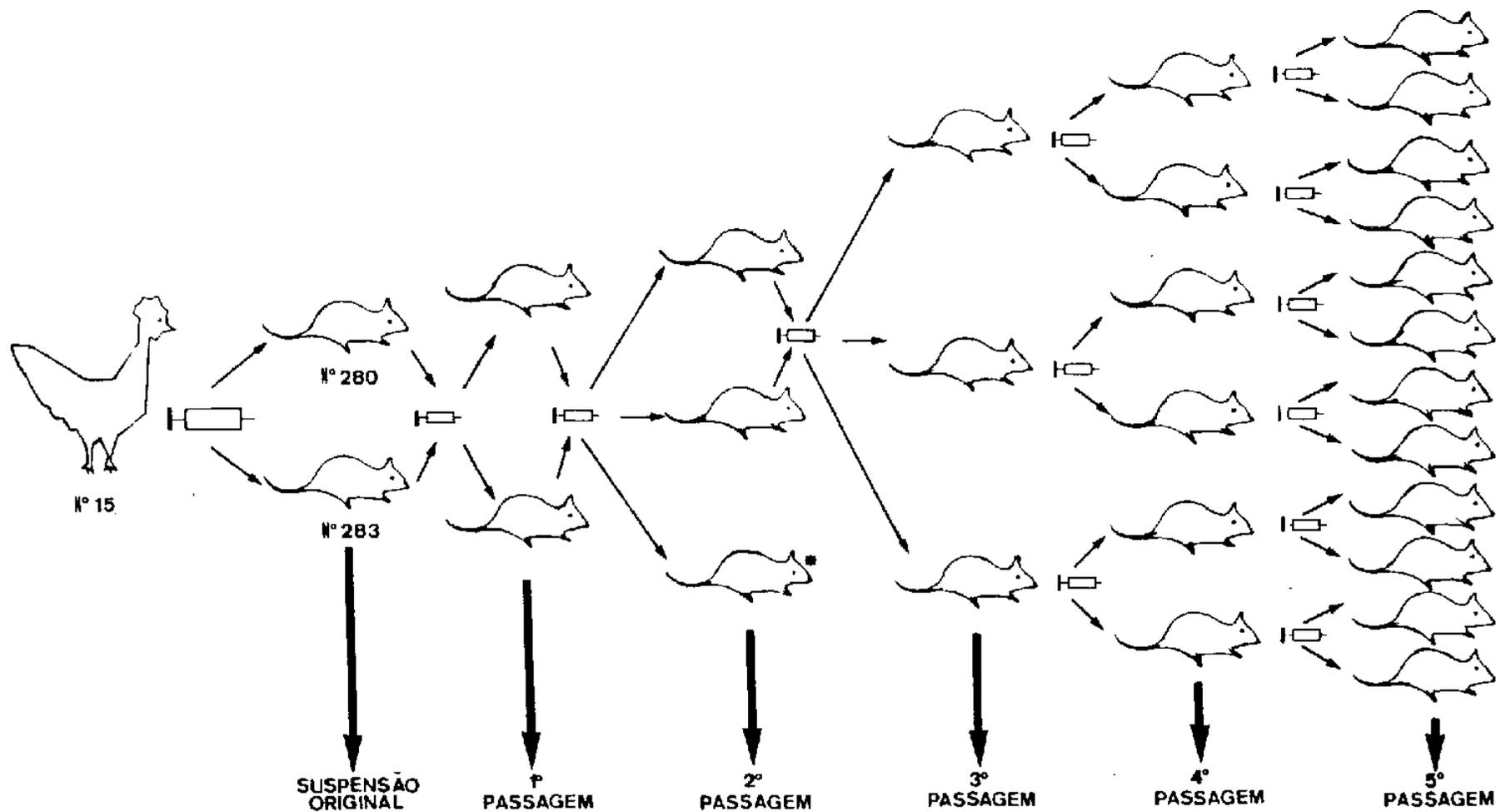
No sentido de manter uma das amostras do *T. gondii*, isolada do cérebro e do coração de uma das galinhas (número 15), foi feito um homogeneizado de cérebro, pulmão, fígado e baço (processados conforme o item 3.3.2.) dos camundongos números 280 e 283 e inoculado, por via subcutânea, na quantidade de 1 ml em cada dois camundongos e desta mesma forma, sucessivamente, em lotes de camundongos conforme Figura 1.

3.6. Mensuração

As mensurações de cistos e taquizoítas foram feitas com auxílio de microscópio óptico Dialux 20 EB³ com ocular micrométrica SK-I5 Wild⁴. Os cistos foram medidos nos esfregaços e nos cortes histológicos de cérebro, enquanto que os taquizoítas foram medidos nas impressões de pulmão.

3 Leitz Wetzlar, República Federal da Alemanha.

4 Wild Heerbrugg, Suíça.



• NÃO FORAM REALIZADAS PASSAGENS COM OS ÓRGÃOS DESTE CAMUNDONGO.

FIGURA 1. Fluxograma de cinco passagens do *Toxoplasma gondii* realizadas em camundongos a partir do homogeneizado de cérebro, pulmão, fígado e baço, provenientes dos camundongos de números 280 e 283, os quais foram inoculados com cérebro e coração, respectivamente, da galinha de número 15.

3.7. Fotomicrografia

As estruturas identificadas como *T. gondii* foram fotografadas com o auxílio de uma câmara fotográfica Wild MPS 51⁴, utilizando-se filme Panatomic -X FX 36-ISO 32/16° Kodak e filme Fujicolor de 35 mm, 100 ISO. A câmara se encontrava acoplada a um microscópio Dialux 20 EB³. O tempo de exposição foi medido com fotômetro automático Wild MPS 55⁴.

4. RESULTADOS

4.1. Necropsia das aves

Todas as vinte aves adquiridas apresentavam-se aparentemente saudáveis. Na necropsia observou-se apenas pequenas alterações tais como: presença de líquido seroso no saco pericárdio (galinhas de números 8, 12, 16 e 17); avermelhamento da mucosa do duodeno (galinhas de números 3 e 12) e presença de helmintos intestinais em praticamente todas as aves, exceto as de números 5, 6, 11 e 17.

4.2. Exame de cérebro das aves

Em nenhuma galinha foi possível evidenciar a presença de cistos e taquizoítas do *T. gondii* no cérebro, através do exame direto, tanto pelo exame a fresco, como pelo esfregaço corado pelo Giemsa.

4.3. Detecção da parasitemia

Não foi possível evidenciar indiretamente a presença do *T. gondii* no sangue de nenhuma ave, através da inoculação em camundongos.

4.4. Isolamento do *Toxoplasma gondii* de órgãos de galinhas naturalmente infectadas

Foi possível isolar o *T. gondii* de 6 aves (galinhas de nº 1, 2, 3, 7, 10 e 15) de um total de 20 galinhas examinadas, obtendo-se assim 30% de aves positivas. Nestas 6 galinhas, o isolamento se deu a partir da suspensão de fragmentos dos seguintes órgãos isoladamente: cérebro, coração, ovário-oviduto e baço (Tab. 1). O órgão do qual foi mais frequente o isolamento foi o coração, tendo-se isolado o parasito deste órgão em todas as 6 aves positivas (galinhas de nºs 1, 2, 3, 7, 10 e 15), estando assim o *T. gondii* presente no coração em 30% do total de galinhas examinadas e em 100% dentre as aves positivas. O segundo órgão em frequência de obtenção de isolamento foi o cérebro, sendo isto possível em 4 aves (galinhas de nºs 1, 3, 10 e 15). O percentual de positividade para este órgão foi da ordem de 20% das aves examinadas e de 66,7% das aves positivas. Nas suspensões de ovário-oviduto e de baço também obteve-se o isolamento, no entanto, este ocorreu somente em uma galinha (galinha de nº 10). Nestes dois órgãos a presença do parasito foi de apenas 5% do total de aves exa-

TABELA 1.

DEMONSTRAÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL PELO
Toxoplasma gondii, EM GALINHAS NATURALMENTE INFECTADAS,
 VERIFICADO, INDIRETAMENTE, ATRAVÉS DE INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Nº das galinhas	Órgãos			
	Cérebro	Coração	Ovário- Oviduto	Baço
1	+	+	-	-
2	-	+	-	-
3	+	+	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	+	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	+	+	+	+
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	+	+	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-

(+) = Presença do parasito.

(-) = Ausência do parasito.

minadas e de 16,7% das aves positivas (Tab. 2).

Na Figura 2 encontra-se o diagrama sobre os isolamentos do *T. gondii* em camundongos. Neste pode-se verificar que, com exceção das suspensões de ovário-oviduto e de baço, em que somente 1 dos 2 camundongos inoculados foi positivo, todos os outros isolamentos foram possíveis em ambos os camundongos inoculados para cada órgão.

Em nenhuma oportunidade foi possível o isolamento do *T. gondii* a partir da suspensão de fragmentos dos seguintes órgãos: fígado, pulmão, músculo peitoral e rim.

4.5. Diagnóstico de toxoplasmose nos camundongos inoculados com suspensão de órgãos de galinhas naturalmente infectadas

4.5.1. Sintomatologia dos camundongos

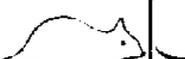
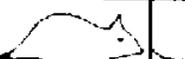
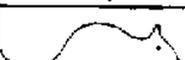
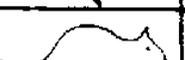
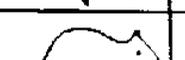
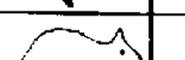
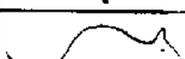
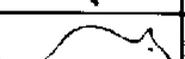
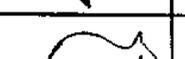
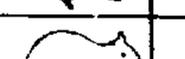
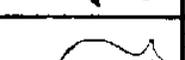
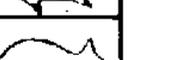
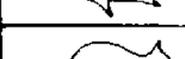
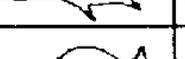
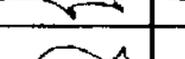
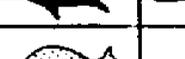
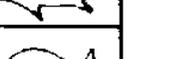
Os camundongos, nos quais foi possível o isolamento do *T. gondii*, adoeceram entre o 11° e o 20° DPI. Em alguns casos os animais morreram e, aparentemente, não apresentaram sintomatologia (n°s 22, 42, 184 e 194). Em todos os animais que adoeceram observou-se apatia, taquipnéia, dorso arqueado e pelos arrepiados. Alguns animais apresentaram emagrecimento (n°s 40, 41, 123 e 281) e em somente um camundongo foi observado abdomen dilatado (n° 1).

A morte natural dos camundongos ocorreu geralmente entre o 12° e o 21° DPI. Apenas os camundongos de n°s zero e

TABELA 2.

NÚMERO E PERCENTUAL DE ISOLAMENTOS DO *Toxoplasma gondii* NAS GALINHAS EXAMINADAS E NAS GALINHAS POSITIVAS

Órgãos	Galinhas examinadas		Galinhas positivas	
	Positivo Nº (%)	Negativo Nº (%)	Positivo Nº (%)	Negativo Nº (%)
Coração	6 (30)	14 (70)	6 (100)	0 (0)
Cérebro	4 (20)	16 (80)	4 (66,7)	2 (33,3)
Ovário-Oviduto	1 (5)	19 (95)	1 (16,7)	5 (83,3)
Baço	1 (5)	19 (95)	1 (16,7)	5 (83,3)

ÓRGÃOS	GALINHAS POSITIVAS					
	1	2	3	7	10	15
CÉREBRO						
						
CORAÇÃO						
						
OVÁRIO E OVIDUTO						
						
BAÇO						
						

 POSITIVO.

 NEGATIVO.

 ENCONTRADO MORTO. PREJUDICANDO O EXAME DEVIDO À AUTÓLISE.

FIGURA 2. Diagrama de isolamentos do *Toxoplasma gondii* em camundongos inoculados com órgãos de galinhas naturalmente infectadas.

184 morreram, respectivamente, no 27° e 29° DPI. Já os de n°s 40, 41 e 281, apesar de terem apresentado sintomatologia, sobreviveram e foram então sacrificados, os dois primeiros no 30° e o último no 92° DPI (Tab. 3).

4.5.2. Necropsia dos camundongos

As principais alterações macroscópicas encontradas nos camundongos, nos quais obteve-se o isolamento do *T. gondii*, estavam localizadas principalmente no pulmão. Os pulmões apresentaram-se volumosos, congestos e edematosos. Em apenas dois camundongos, os de n° 1 e 2, verificou-se hemotórax com presença de fibrina aderida à pleura. De maneira geral, o fígado e o baço estavam aumentados e congestos e o conteúdo do intestino delgado era líquido e de coloração alaranjada ou avermelhada. O animal de n° 1 foi o único que apresentou exsudato sero-fibrinoso na cavidade abdominal, estando a fibrina aderida ao fígado e ao baço.

Nos camundongos que não adoeceram e que foram sacrificados após o 30° DPI, não foram observadas lesões macroscópicas.

4.5.3. Presença de formas evolutivas (cistos) do Toxoplasma gondii no cérebro dos camundongos

Na Tabela 4 observam-se os resultados da presença de cistos de *T. gondii* no cérebro dos camundongos inoculados com

TABELA 3.

NÚMERO DE DIAS, APÓS A INOCULAÇÃO,
EM QUE OCORREU A MORTE DOS CAMUNDONGOS, NOS
QUAIS FOI POSSÍVEL O ISOLAMENTO DO *Toxoplasma gondii*

Número do camundongo	Número da ave	Órgão inoculado no camundongo	Morte dos camundongos (DPI*)
zero	1	cérebro	27
1	1	cérebro	17
2	1	coração	21
3	1	coração	21
22**	2	coração	15
23	2	coração	16
40***	3	cérebro	30
41***	3	cérebro	30
42**	3	coração	13
43	3	coração	16
122	7	coração	17
123	7	coração	18
180	10	cérebro	16
181	10	cérebro	16
182	10	coração	16
183	10	coração	17
184**	10	ovário-oviduto	29
194**	10	baço	18
280	15	cérebro	12
281***	15	cérebro	92
282	15	coração	12
283	15	coração	15

* DPI = dias pós-inoculação.

** Animal morreu sem sintomatologia aparente.

*** Animal sacrificado.

TABELA 4.

PRESENÇA DE CISTOS E DE TAQUIZOÍTAS DO
Toxoplasma gondii EM 22 CAMUNDONGOS INOCU-
 LADOS COM ÓRGÃOS DE GALINHAS NATURALMENTE INFECTADAS

Nº do camundongo	Presença de cistos no cérebro		Presença de taquizoítas no pulmão
	Exame a fresco	Esfregaço	Impressão
zero	-	+	-
1	-	-	+
2	+	+	+
3	+	+	+
22	-	+	+
23	+	+	+
40	+	+	+
41	+	+	+
42	-	+	+
43	+	+	+
122	+	+	+
123	+	+	+
180	-	-	+
181	-	-	+
182	+	+	+
183	+	+	+
184	-	-	+
194	-	-	+
280	-	-	+
281	+	+	-
282	-	-	+
283	+	+	+

(+) = Presença de parasito.

(-) = Ausência de parasito.

órgãos de galinhas.

Do total de 22 camundongos, nos quais obteve-se o isolamento do *T. gondii*, cistos foram vistos em 12 camundongos quando realizado o exame a fresco do cérebro e em 15 camundongos quando realizado o esfregaço do cérebro corado pelo Giemsa. Em nenhuma oportunidade o exame a fresco foi positivo com esfregaço negativo, ao passo que o inverso ocorreu em três oportunidades (n°s zero, 22 e 42).

Os cistos puderam ser visualizados no cérebro dos camundongos a partir do 13° DPI.

No exame a fresco do cérebro, os cistos apresentaram-se esféricos ou subesféricos e de diferentes tamanhos. Os cistos, quase sempre, eram estruturas bem definidas (Fig. 3), podendo-se observar uma parede fina que envolvia dezenas ou centenas de pequenos organismos no seu interior (Fig. 4).

Através do esfregaço do cérebro, corado pelo Giemsa, obteve-se uma melhor visualização dos cistos. Foi possível a observação de vários cistos em um mesmo campo (Fig. 5). Também neste exame, os cistos apresentaram-se esféricos ou subesféricos. Na Tabela 5 observam-se as dimensões dos cistos nos esfregaços de cérebro. O índice morfológico encontrado foi de $1,09 \pm 0,21$. O cálculo deste índice foi feito tirando-se a média da razão dos diâmetros maior e menor dos cem cistos medidos. Apesar de não ser muito espesso, o contorno da parede cística, corando-se de rosa, foi bem definido. O núcleo dos bradizoítas estava bem corado, definindo-se melhor a presença desses organismos dentro do cisto (Fig. 6). Já que, na maior parte dos casos, os cistos

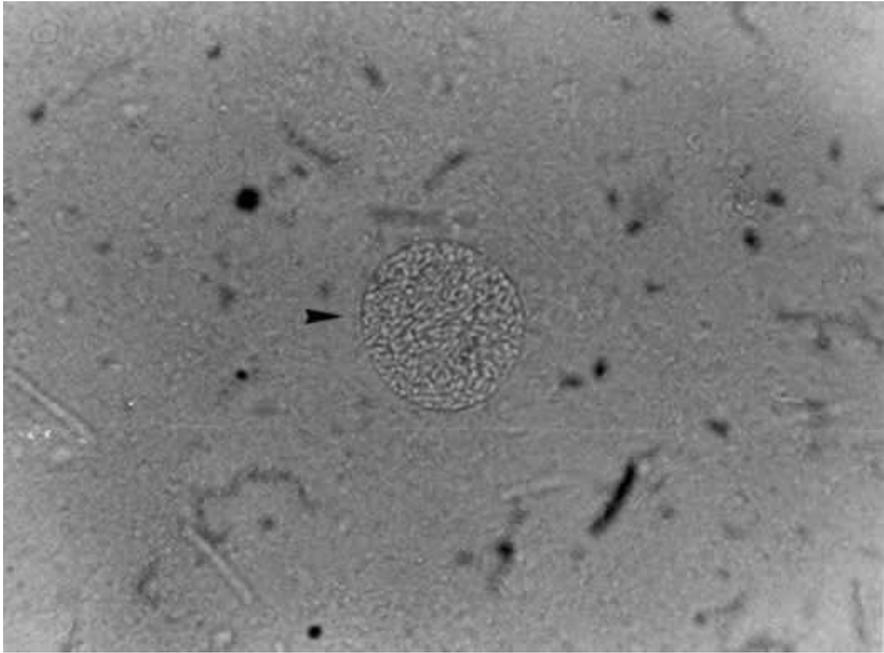


FIGURA 3. Cisto (>) de *Toxoplasma gondii* em exame a fresco de cérebro de camundongo, 400 X.

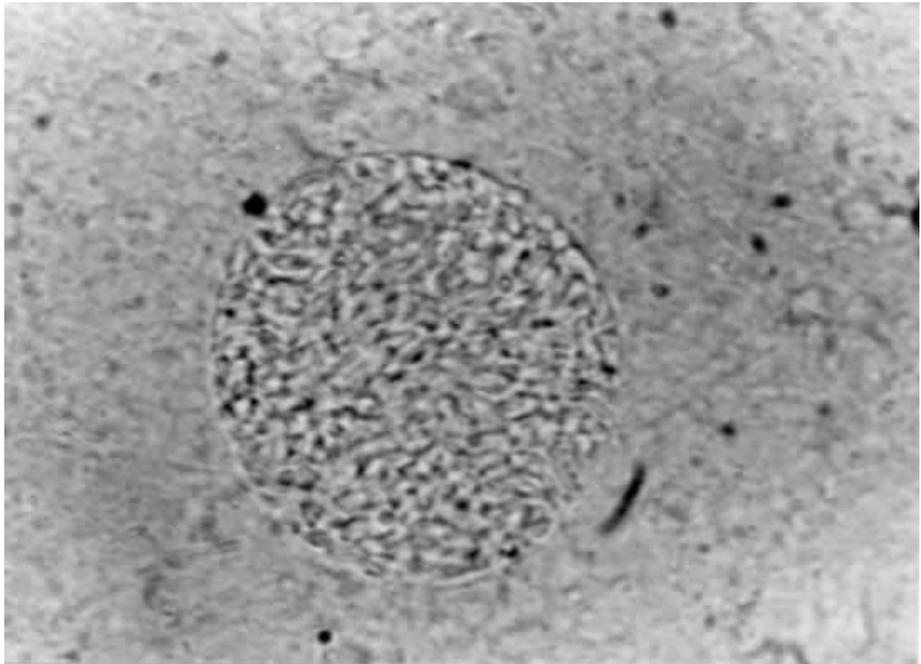


FIGURA 4. Figura anterior em maior aumento para visualização da parede cística e dos bradizoítas. Exame a fresco, 1000 X.

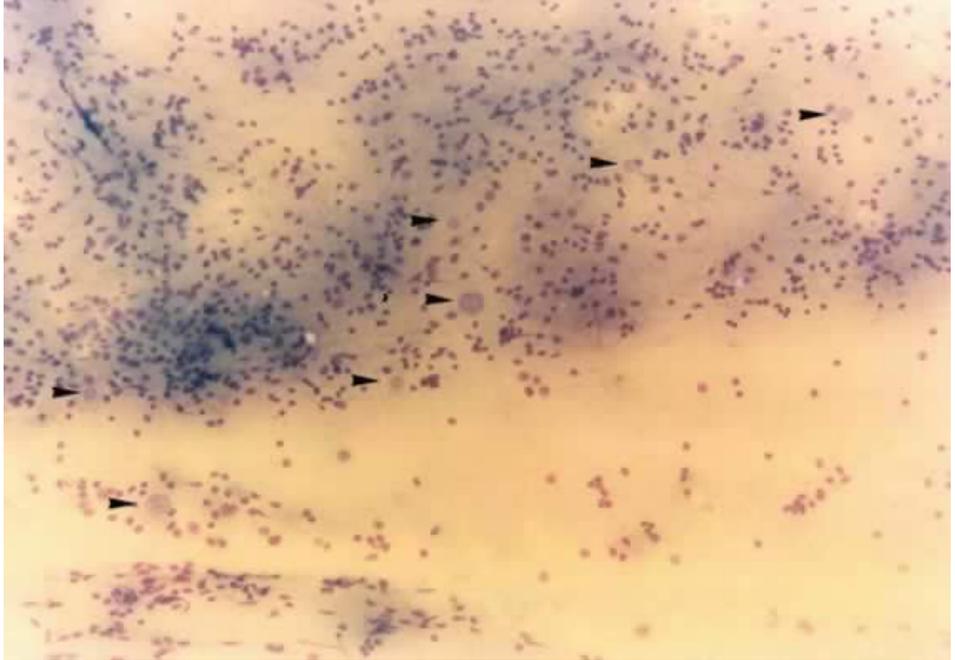


FIGURA 5. Cistos (▶) de *Toxoplasma gondii*, com diferentes tamanhos, em esfregaço de cérebro de camundongo. Giemsa, 100 X.

TABELA 5.

DIMENSÕES DE CISTOS* DO *Toxoplasma gondii*, EM ESFREGAÇOS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM ÓRGÃOS DE GALINHAS NATURALMENTE INFECTADAS

Dimensões (µm)	Limite		Média e desvio padrão
	Menor	Maior	
Diâmetro menor	10	50	26,3 ± 7,74
Diâmetro maior	10	50	28,1 ± 7,48

* Números de 100 cistos mensurados.

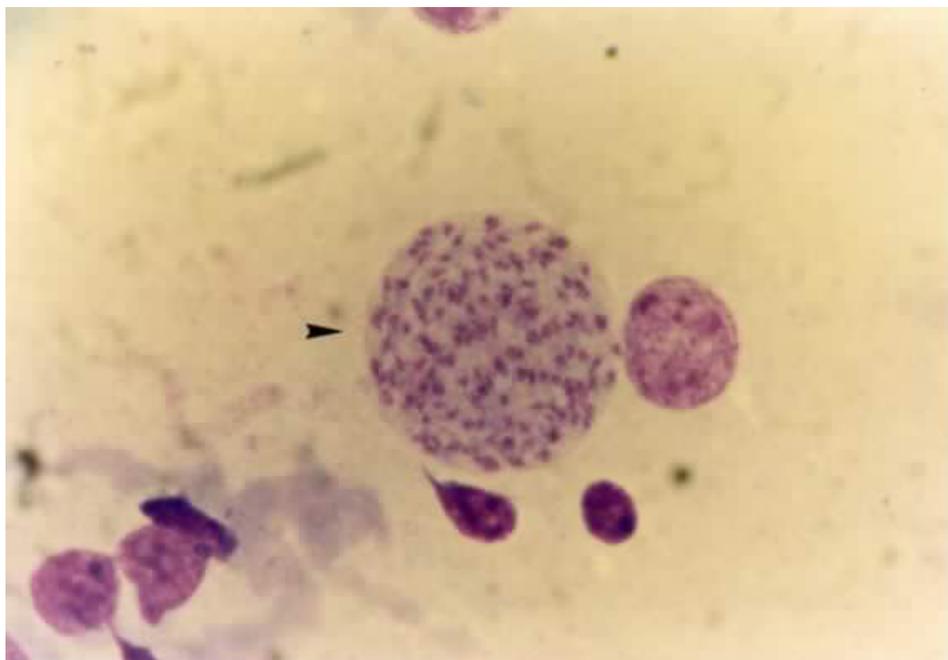


FIGURA 6. Cisto (➤) de *Toxoplasma gondii* em esfregaço de cérebro de camundongo. Giemsa, 1000 X.

continham grande número de organismos, ficou difícil estabelecer a posição do núcleo dentro de cada bradizoíta. Por vezes, nos esfregaços de cérebro, também pôde-se observar alguns cistos contendo menor número de bradizoítas, bem como organismos extracelularmente localizados. Em ambos os casos, evidenciou-se o núcleo de posição subterminal.

Não se verificou a presença do *T. gondii* no cérebro dos camundongos que não adoeceram e que foram sacrificados no 30° DPI.

4.5.4. Presença de formas evolutivas (taquizoítas) do

***Toxoplasma gondii* no pulmão dos camundongos**

Ainda na Tabela 4, observam-se também os resultados referentes à presença de taquizoítas do *T. gondii* nas impressões de pulmão dos camundongos inoculados com órgãos de galinhas. Estas estruturas foram verificadas no pulmão dos camundongos mortos naturalmente a partir do 12° DPI, estando ainda presentes nos camundongos que adoeceram e foram sacrificados no 309 DPI (n°s 40 e 41). Dos 22 animais positivos, 20 camundongos apresentaram estas estruturas. Em um total de sete animais (n°s 1, 180, 181, 184, 194, 280 e 282) foram evidenciados taquizoítas de *T. gondii* nas impressões de pulmão, embora os exames de cérebro desses animais tivessem sido negativos. Por outro lado, em apenas duas vezes ocorreu o inverso (n°s zero e 281).

Na maior parte dos casos das impressões de pulmão,

O *T. gondii* apresentou-se extracelularmente, podendo ser visto isoladamente (Fig. 7) ou formando pequenos ou grandes aglomerados de organismos (Figs. 8 e 9). Estas estruturas, geralmente, apresentaram a forma característica de meia-lua com o núcleo bem corado (Figs. 7 e 8). Este núcleo posicionava-se central (Fig. 7) ou subterminalmente (Fig. 8). No entanto, foram visualizados vários organismos com as extremidades arredondadas que possuíam o núcleo menos corado, de posição central ou subterminal (Fig. 10). Organismos com o núcleo em divisão e em posição central também foram vistos. O *T. gondii* pôde ser visualizado no interior de macrófagos (Fig. 11). Ainda, nas impressões de pulmão, o parasito foi observado intracelularmente formando até mesmo cistos (Fig. 12).

Não se verificou a presença do *T. gondii* no pulmão dos camundongos que não adoeceram e foram sacrificados no 30° DPI.

Na Tabela 6 encontram-se as dimensões dos organismos extracelulares, taquizoítas, nas impressões de pulmão.

4.5.5. Exame histológico dos camundongos

No exame do encéfalo verificou-se, em vários camundongos, a presença do *T. gondii*, principalmente sob a forma de cistos; raramente, ainda eram vistos alguns endozoítas. Em alguns casos, havia pequenos focos de gliose. Ao redor dos cistos não se encontrou qualquer reação inflamatória e quando corados pela hematoxilina-eosina (H.E.), os cistos apareceram como estruturas bem definidas (Fig. 13). Quando corados pelo à-

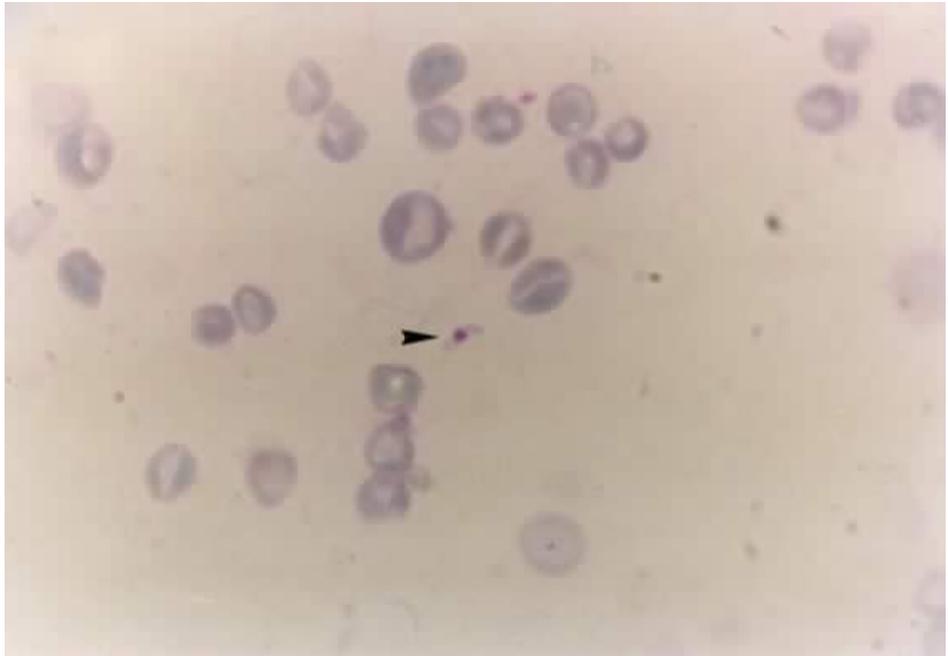


FIGURA 7. Taquizoíta (▶) de *Toxoplasma gondii* em impressão de pulmão de camundongo. Notar núcleo de posição central. Giemsa, 1000 X.

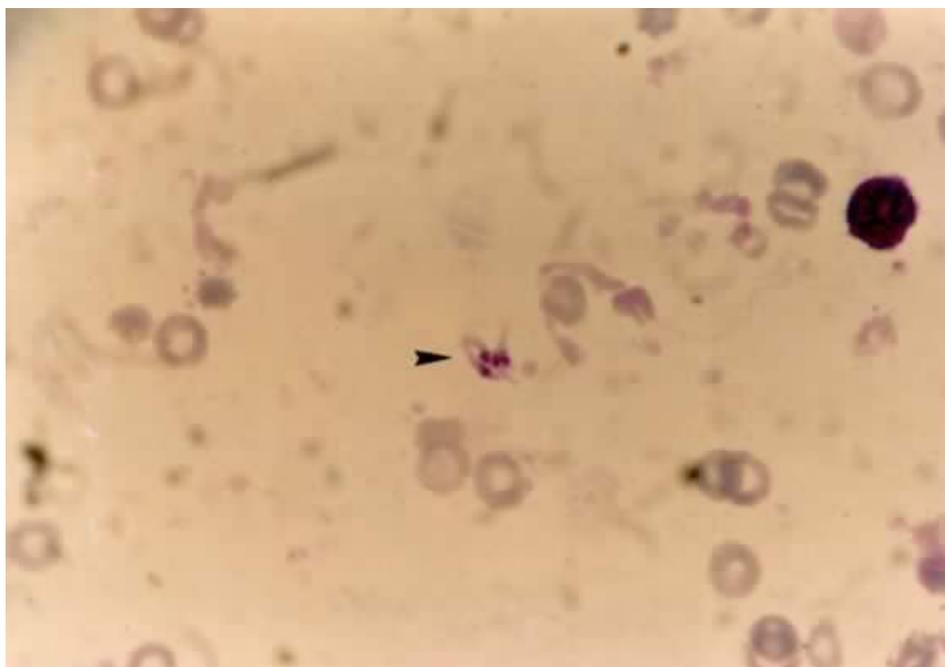


FIGURA 8. Taquizoítas (▶) de *Toxoplasma gondii*, livres, em impressão de pulmão de camundongo. Notar núcleo de posição subterminal. Giemsa, 1000 X.

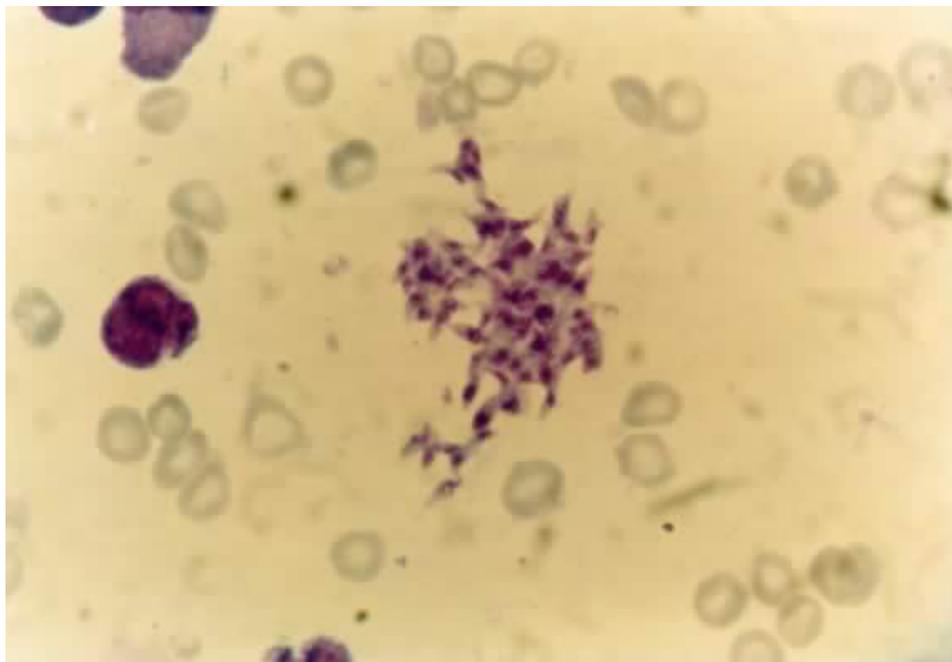


FIGURA 9. Tachizoítas de *Toxoplasma gondii*, livres e aglomerados. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X.



FIGURA 10. Taquizoíta (▶) de *Toxoplasma gondii* apresentando as extremidades arredondadas e o núcleo menos corado. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X.

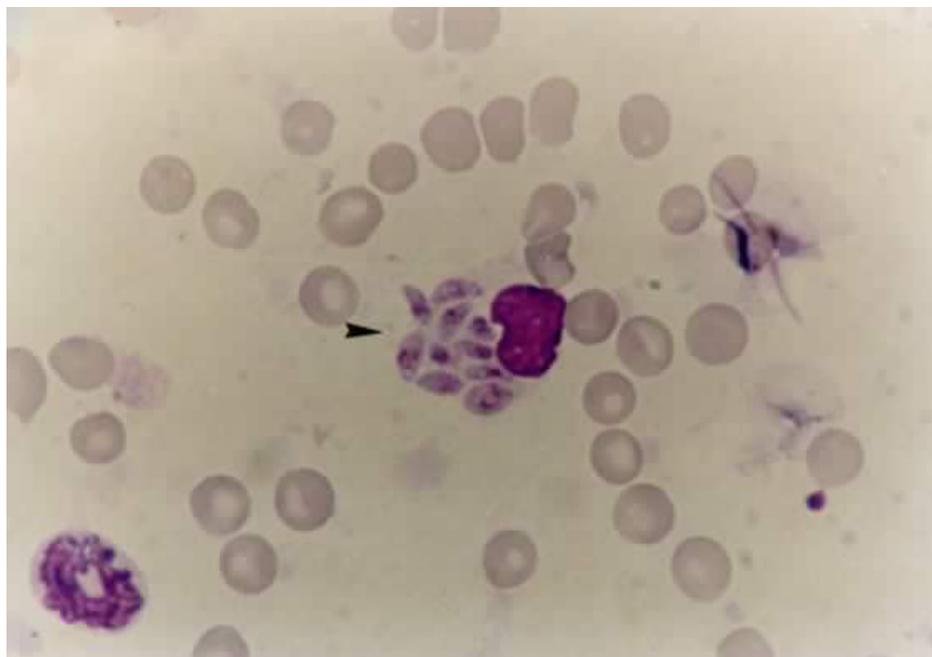


FIGURA 11. Macrófago (➤) apresentando formas intracelulares do *Toxoplasma gondii*. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X.

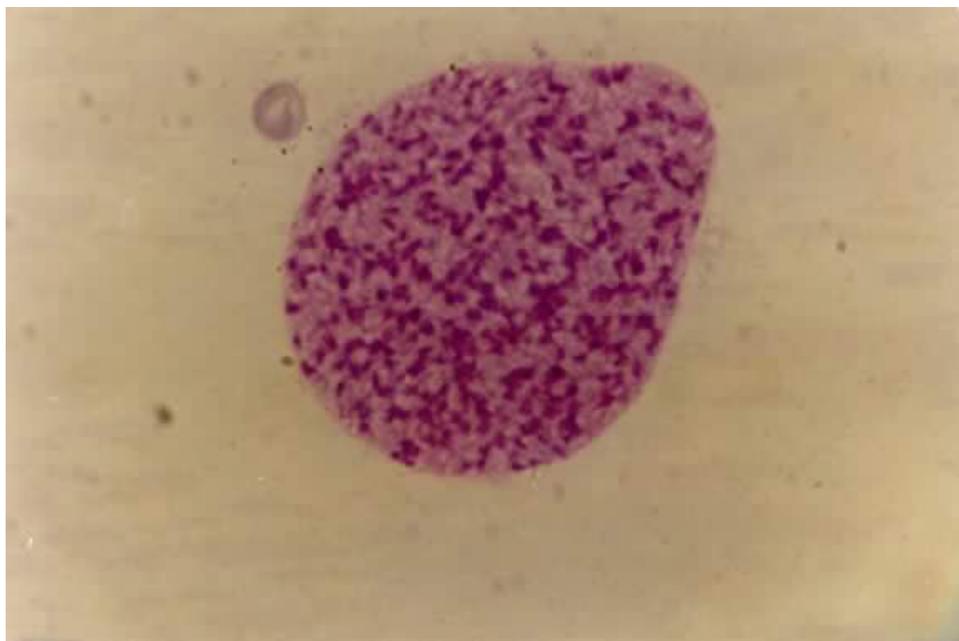


FIGURA 12. Cisto de *Toxoplasma gondii*. Impressão de pulmão de camundongo. Giemsa, 1000 X.

TABELA 6.

DIMENSÕES DOS TAQUIZOÍTAS* EXTRACELULARES
 DO *Toxoplasma gondii*, EM IMPRESSÕES DE PULMÃO DE CAMUNDON-
 GOS INOCULADOS COM ÓRGÃOS DE GALINHAS NATURALMENTE INFECTADAS

Dimensões (µm)	Limite		Média e desvio padrão
	Menor	Maior	
Comprimento	3,70	6,20	4,50 ± 0,60
Largura	1,20	3,20	2,10 ± 0,44

* Números de 100 taquizoítas mensurados.

cido periódico de Schiff (PAS) , os cistos eram facilmente visíveis em pequeno aumento. Os bradizoítas coravam-se de vermelho brilhante, e continham grânulos PAS positivos no seu interior (Fig. 14).

As médias e seus respectivos desvios padrão de 10 cistos medidos nos cortes histológicos de cérebro foram: $12 \pm 4,21$ um com limites variando de 10 a 20 um para o diâmetro maior e de $10 \pm 0,00$ para o diâmetro menor. O índice morfológico obtido foi de $1,20 \pm 0,42$.

Em todos os casos examinados, o pulmão apareceu lesado, sendo bastante freqüente a presença do parasito neste órgão. A lesão observada no pulmão foi constante e constituiu-se de pneumonia intersticial difusa (Fig. 15). O interstício achava-se infiltrado por macrófagos e neutrófilos e os espaços alveolares parcialmente preenchidos por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais descamadas e algumas vezes por edema e algumas hemácias. O *T. gondii* pôde ser visto livremente no interior dos alvéolos, ou intracelularmente dentro de macrófagos soltos no espaço alveolar ou em células endoteliais ou pneumócitos (Fig. 16). Estruturas semelhantes a cistos também foram visualizadas (Fig. 17) e quando coradas pelo PAS foram positivas (Fig. 18).

Constantemente havia infiltrado mononuclear com presença de alguns neutrófilos entre as fibras cardíacas e, algumas vezes, a lesão esteve associada a degeneração de fibras cardíacas. Em um caso, o *T. gondii* pôde ser visto como formas proliferativas e também como formas bem definidas, semelhan-

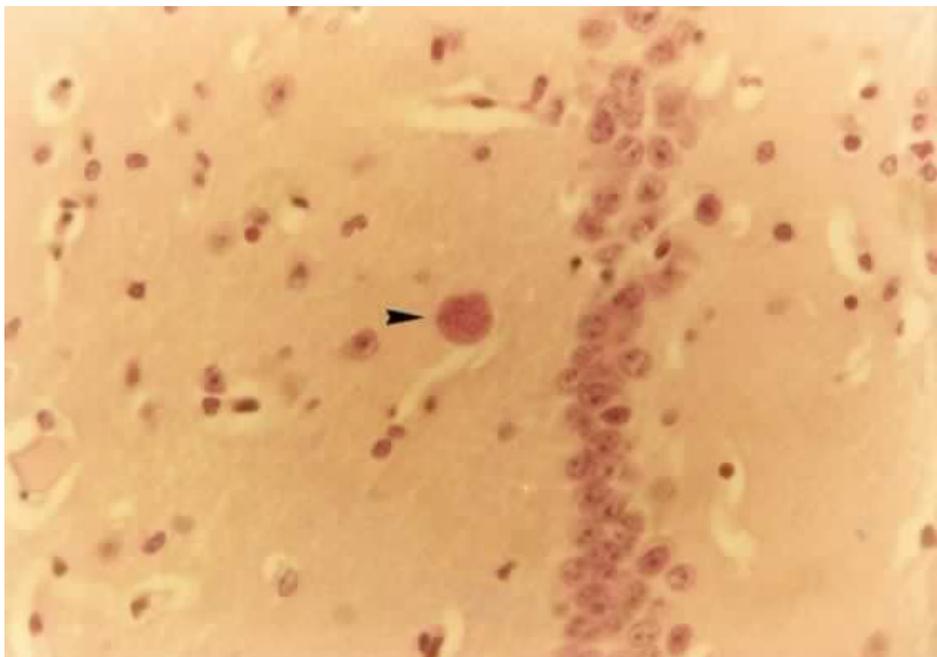


FIGURA 13. Cisto () de *Toxoplasma gondii* em cérebro de camundongo. Notar ausência de reação inflamatória ao redor do cisto. H.E., 400 X.



FIGURA 14. Dois cistos de *Toxoplasma gondii*, no interior dos quais se observam bradizoítas com grânulos P.A.S. positivos. Cérebro de camundongo. P.A.S., 1000 X.

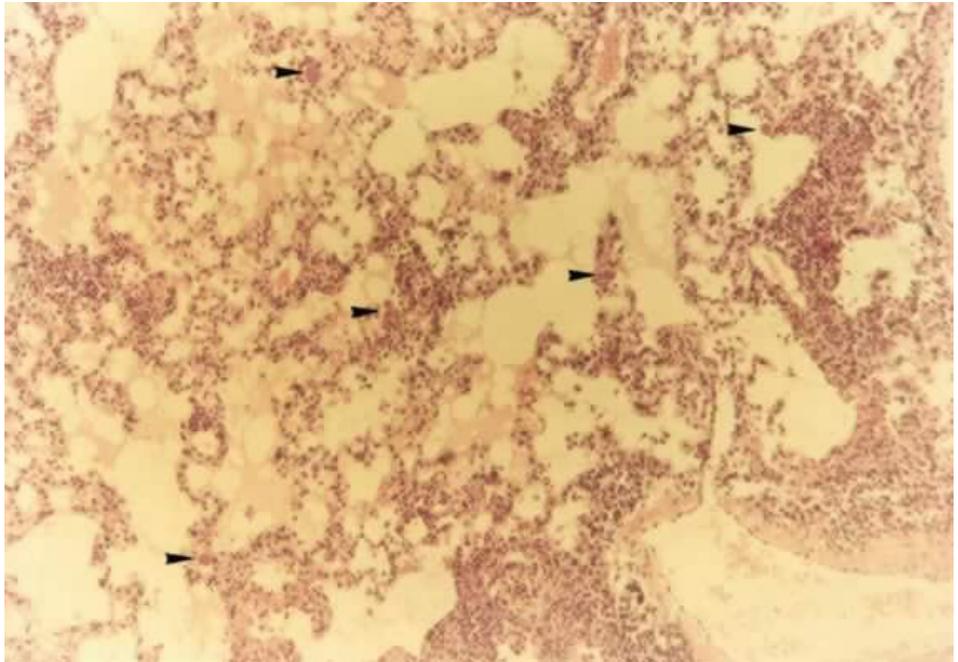


FIGURA 15. Pneumonia intersticial com a presença de várias formas do *Toxoplasma gondii* (►). Pulmão de camundongo. H.E., 100 X.

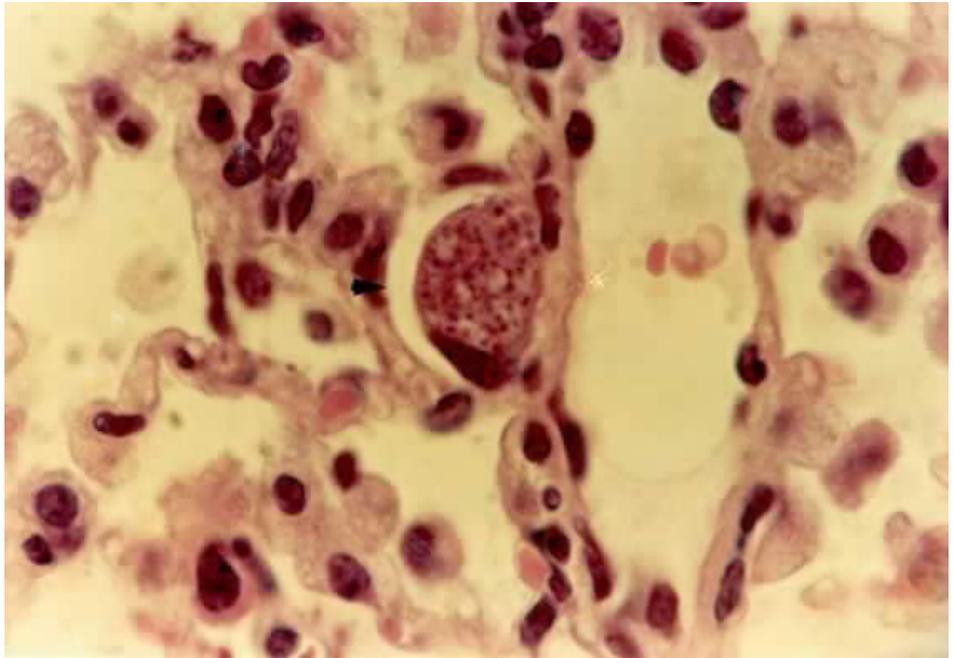


FIGURA 16. Endozoítas (➤) de *Toxoplasma gondii*, vistos no citoplasma de uma célula da parede alveolar. Pulmão de camundongo. H.E., 1000 X.

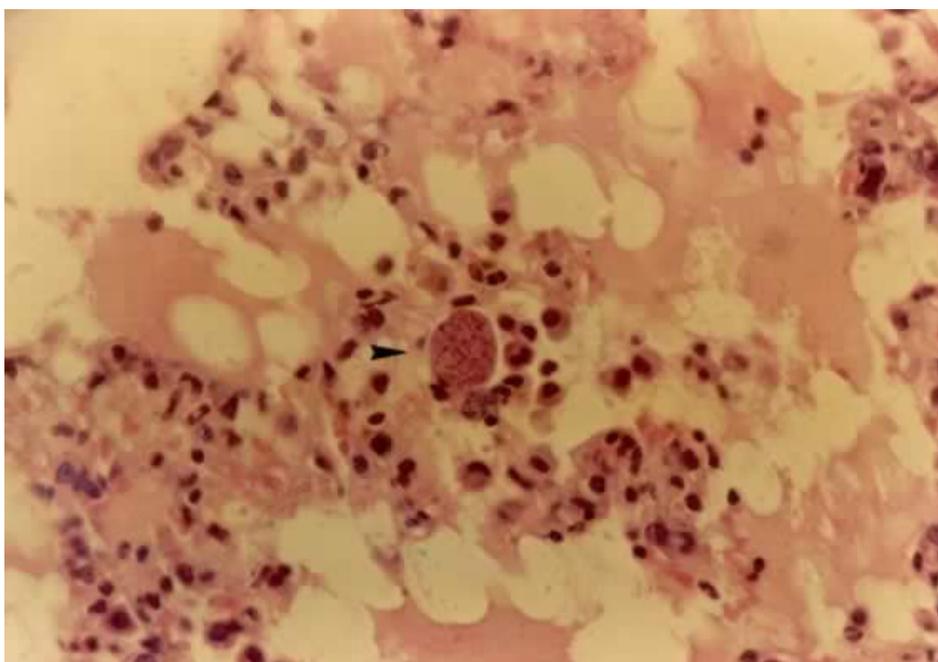


FIGURA 17. Estrutura semelhante a um cisto (➤) de *Toxoplasma gondii* em pulmão de camundongo. H.E., 400 X.

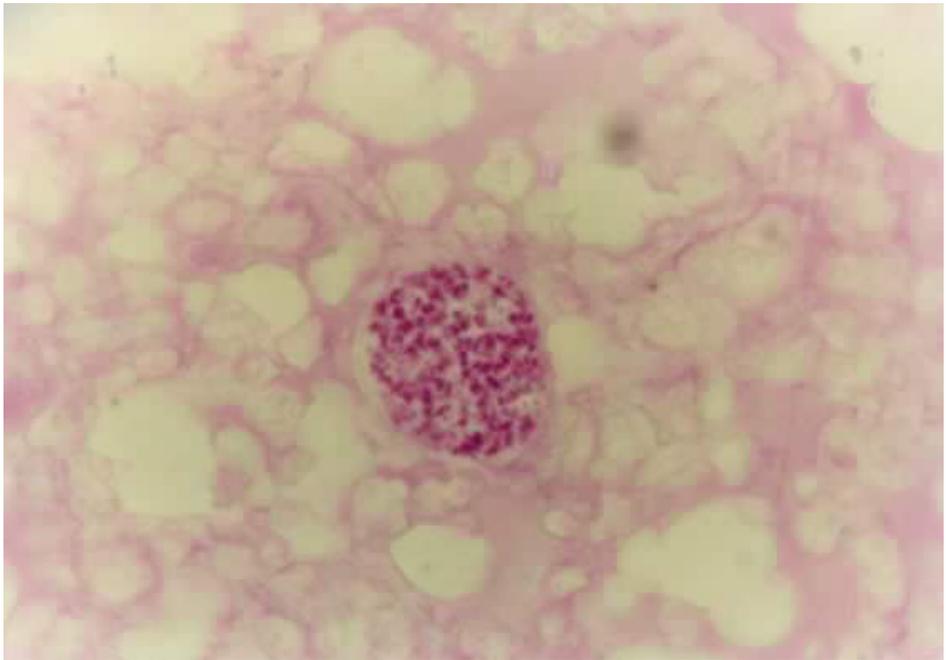


FIGURA 18. Estrutura semelhante a um cisto de *Toxoplasma gondii* contendo organismos com alguns grânulos P.A.S. positivos. Pulmão de camundongo. P.A.S., 1000 X.

tes a cistos, parasitando as fibras cardíacas.

Apesar de não haver alterações microscópicas aparentes no baço, o parasito foi visto em células reticulares em um dos animais parasitados.

Em geral, o fígado foi um órgão bastante alterado, onde se observou microgranulomas disseminados por todo parênquima e infiltrado inflamatório constituído principalmente por células mononucleares no interior dos sinusóides. Algumas vezes, foram notados focos de necrose acompanhados de hemorragia e acúmulos de células mononucleares em volta dos vasos sanguíneos. A visualização do *T. gondii* no fígado foi difícil e somente pôde ser realizada uma única vez, com o auxílio da objetiva de 100 X.

No fim somente havia pequenos infiltrados de células mononucleares.

4.6. Manutenção do *Toxoplasma gondii* em laboratório através do passagens em camundongos

Foi possível manter o *T. gondii* no laboratório, nas 5 passagens realizadas em camundongos. Na Figura 19 observa-se a sequência das passagens com respectivos dias da morte dos camundongos. Excetuando dois camundongos, um da 2^a passagem e outro da 5^a passagem, que apesar de terem adoecido, sobreviveram e foram então sacrificados após o 30° DPI, todos os outros camundongos não foram capazes de sobreviver e morreram entre o 7° e

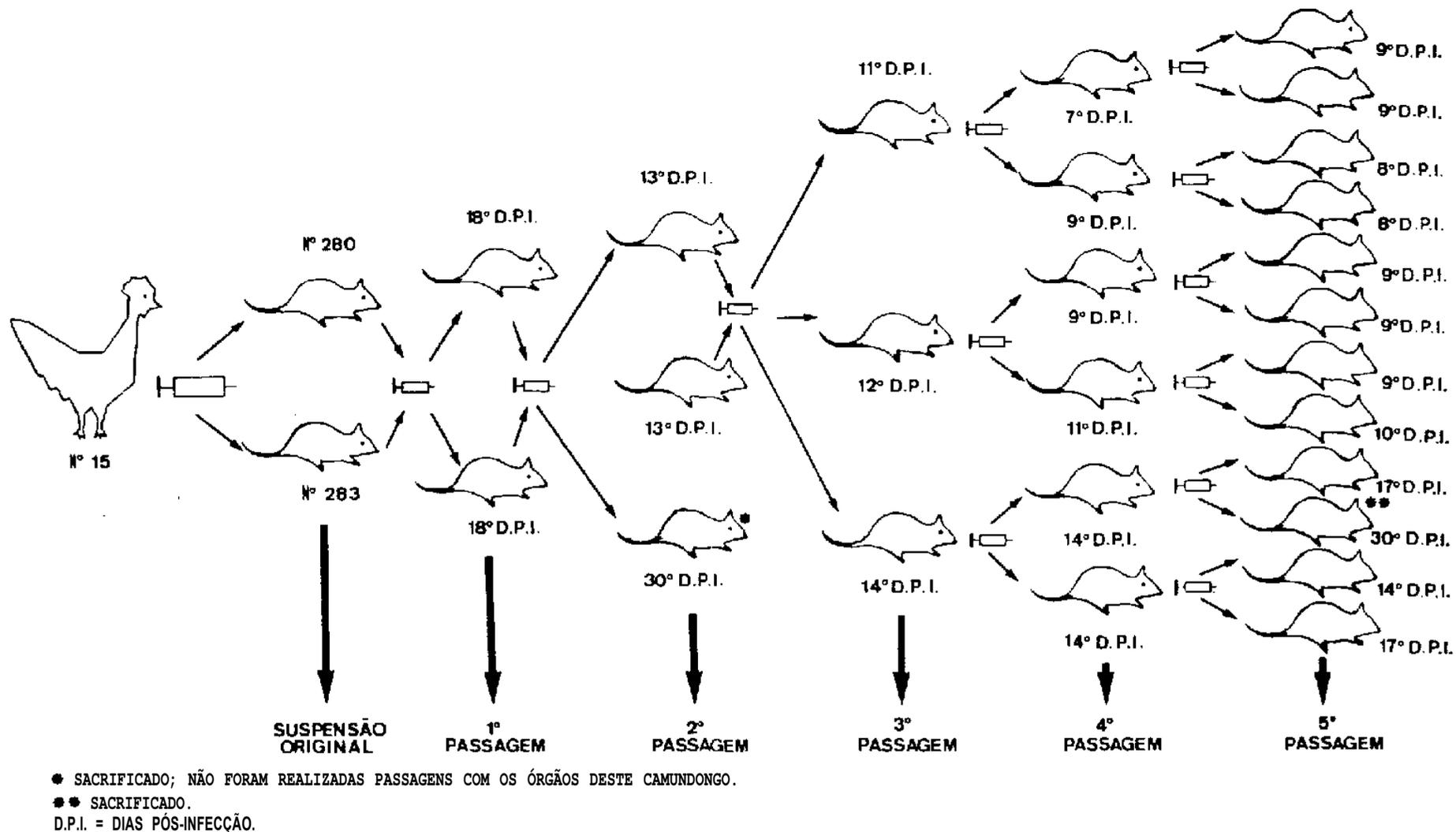


FIGURA 19. Fluxograma de passagens do *Toxoplasma gondii* em camundongos e respectivos dias da morte dos roedores inoculados por via subcutânea com homogeneizados de órgãos. A suspensão original foi proveniente dos camundongos 280 e 283, os quais foram anteriormente inoculados com o cérebro e o coração, respectivamente, da galinha de número 15.

o 18° DPI.

A média dos dias da morte natural, isto é, sem levar em consideração dos dois camundongos que foram sacrificados no 30° DPI, foram, para a 1ª., 2ª., 3ª., 4ª., a 5ª. passagens, respectivamente: 18; 13; 12,3; 10,7 e 10,8 dias.

A Tabela 7 mostra os detalhes sobre os resultados destas passagens. Dos 26 animais utilizados nas 5 passagens, 7 apresentaram cistos no cérebro quando realizado o exame a fresco, aumentando este resultado para 11 animais quando o cérebro foi também examinado através de esfregaços. A presença de cistos foi mais freqüente nas 3 primeiras passagens, estando presente em 7 dos 8 animais utilizados. Na 4ª passagem não foi verificada a presença de cistos nos 6 animais utilizados e na 5ª passagem foi verificada apenas em 4 dos 12 camundongos utilizados. Com relação à presença de formas extracelulares (taquizoítas) no pulmão, 23 animais foram positivos para essas estruturas. Nos dois camundongos que sobreviveram e foram sacrificados no 309 DPI, verificou-se apenas cistos no cérebro, ambos sendo negativos para as formas livres no pulmão. Além destes dois animais, um outro que só apresentou cistos no cérebro, pertencia à 5ª passagem e morreu no 17° DPI.

TABELA 7.
 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS
 DAS PASSAGENS DE *Toxoplasma gondii* EM
 CAMUNDONGOS INOCULADOS POR VIA SUBCUTÂNEA A PARTIR
 DO HOMOGENEIZADO DE CÉREBRO, PULMÃO, FÍGADO E BAÇO DOS
 CAMUNDONGOS 280 E 283, OS QUAIS FORAM INOCULADOS COM SUSPEN-
 SÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO, RESPECTIVAMENTE, DA GALINHA NÚMERO 15

Passagens	Número de camundongos utilizados	Dias após a inoculação em que ocorreu a morte dos camundongos	Presença de cistos no cérebro		Presença de taquizoítas no pulmão
			Exame a fresco	Esfregaço	Impressão
1ª	2	18ª	+	+	+
		18ª	+	+	+
2ª	3	13ª	-	+	+
		13ª	-	+	+
		30ª *	+	+	-
3ª	3	11ª	-	-	+
		12ª	+	+	+
		14ª	+	+	+
4ª	6	7ª	-	-	+
		9ª	-	-	+
		9ª	-	-	+
		11ª	-	-	+
		14ª	-	-	+
		14ª	-	-	+
5ª	12	8ª	-	-	+
		8ª	-	-	+
		9ª	-	-	+
		9ª	-	-	+
		9ª	-	-	+
		9ª	-	-	+
		9ª	-	-	+
		10ª	-	-	+
		14ª	-	+	+
		17ª	-	+	-
		17ª	+	+	+
30ª *	+	+	-		

* Animal sacrificado.

+ Presença do parasito.

- Ausência do parasito.

5. DISCUSSÃO

O conhecimento dos costumes de uma determinada população tem sido de grande importância para se compreender a epidemiologia da toxoplasmose em uma região. Estes costumes podem influenciar a prevalência de indivíduos soro-reagentes ou intradermo-reatores ao *T. gondii*. O hábito de uma certa população de consumir carne crua ou mal cozida pode determinar elevada frequência de infecção pelo parasito (DESMONTS et al., 1965). No entanto, alguns estudos demonstraram que em determinadas regiões onde este hábito não é comum, a presença do gato, contaminando o solo com oocistos, seria o principal fator responsável pela prevalência de anticorpos para a toxoplasmose (WALLACE, 1969; WALLACE et al., 1972; FRENKEL & RUIZ, 1980 e 1981). WALLACE (1973a) relatou que a presença do gato tem sido indispensável para manutenção do ciclo do *T. gondii* e que, sob um ponto de vista prático, ocorreria também uma dependência de hospedeiros intermediários. Experimentalmente, o camundongo domiciliado, assim como certas espécies de aves podem se comportar como

bons hospedeiros intermediários para infecção de felídeos (WALLACE, 1973b).

O presente trabalho foi realizado numa área peri-urbana com características rurais, tais como a existência de criações de animais domésticos, principalmente com o objetivo de consumo pela população local. Raramente utilizava-se ração comercial na alimentação desses animais, sendo mais comum o uso de milho e restos de comida.

Os gatos da região de Seropédica têm sido criados livremente, com acesso a outras áreas. É bastante provável que estes gatos cacem pequenos animais e se alimentem também de restos de comida, tornando-se assim facilmente infectados pelo *T. gondii*. Sabe-se ainda que gatos com este tipo de comportamento têm uma taxa de infecção muito maior do que os gatos criados exclusivamente dentro de domicílios (DUBEY, 1973). Os oocistos do *T. gondii* são eliminados em grande número nas fezes dos gatos (DUBEY & FRENKEL, 1972) e são bastante resistentes, podendo persistir infectantes por longos períodos (YILMAZ & HOPKINS, 1972; FRENKEL et al., 1975). O papel de hospedeiros-transporte de oocistos (WALLACE, 1971, 1972 e 1973b; MARKUS, 1974; FRENKEL et al., 1975) também deve ser considerado na transmissão, principalmente as minhocas que são uma fonte de alimento para galinhas criadas em condições naturais (MARKUS, 1974; FRENKEL et al., 1975; RUIZ & FRENKEL, 1980).

RUIZ & FRENKEL (1980), baseados no constante acesso das galinhas ao solo, sugerem que a prevalência de oocistos no solo poderia ser facilmente estimada através do isolamento do *T.*

gondii em galinhas. No presente trabalho o isolamento do *T. gondii* em 30% das aves examinadas confirma a presença de oocistos deste protozoário na região estudada, Seropédica, o que sugere um razoável nível de contaminação do solo, já que o parasito foi facilmente isolado de homogeneizado de órgãos (principalmente coração e cérebro) de 6 das vinte galinhas examinadas e procedentes de três áreas (Km 42, 47 e 49) de criações. O parasito foi encontrado em criações distantes até sete quilômetros entre si. Estes resultados corroboram a hipótese de RUIZ & FRENKEL (1980) em se utilizar as galinhas como animal-sentinelas para se detectar o nível de contaminação do solo por oocistos. Assim, apesar de ser possível o isolamento do *T. gondii* de uma determinada amostra de solo (RUIZ et al., 1973), através do exame de uma pequena amostra de galinhas, uma quantidade muito maior de solo poderia, então, ser indiretamente examinada.

Provavelmente as galinhas não são consideradas como animais importantes na transmissão da toxoplasmose humana, já que, geralmente, são consumidas fritas ou bem cozidas (BOCH, 1980; DUBEY, 1986d). No entanto, as galinhas podem funcionar como hospedeiros intermediários, até mesmo para filhotes de gatos, uma vez que é comum as pessoas oferecerem vísceras e cabeça de galinhas a gatos e cães (RUIZ & FRENKEL, 1980),

Com relação à frequência do parasito nos diversos órgãos das galinhas examinadas, o encontro do *T. gondii* principalmente no coração (30%) e no cérebro (20%) é semelhante aos resultados de isolamentos realizados tanto em galinhas in-

fectadas naturalmente (FOSTER et al., 1969) como experimentalmente (BOCH et al., 1966; BIANCIFIORI et al., 1986).

BEVERLEY (1976) relatou que a maioria das cepas do *T. gondii* que ocorre na natureza é de baixa virulência, pois se encista e freqüentemente não mata o animal. DUBEY (1980) considerou que, em infecções experimentais, as cepas patogênicas matam o camundongo dentro de 15 dias, enquanto cepas pouco patogênicas podem determinar a morte dentro de 1 a 2 meses. Geralmente, o tempo de morte é menor após inoculação intraperitoneal do que após inoculação subcutânea (FRENKEL, 1973). O *T. gondii* isolado das galinhas foi fatal para a maioria dos camundongos nos quais obteve-se o isolamento, após inoculação subcutânea, matando 19 dos 22 camundongos, sendo que 17 animais morreram entre o 12° e o 21° DPI e os dois restantes no 27° e 29° DPI, respectivamente.

Após a inoculação intraperitoneal com a cepa GT-1 do *T. gondii*, isolada da musculatura de caprino, DUBEY (1980) encontrou taquizoítas no pulmão dos camundongos mortos entre o 16° e o 22° DPI e mesmo no 34° DPI, resultados que se assemelham aos dados obtidos no presente trabalho, em que os taquizoítas foram observados no pulmão dos camundongos mortos entre o 12° e o 30° DPI. Por outro lado, DUBEY & FRENKEL (1973), com a cepa M7741 do *T. gondii*, isolada do diafragma de ovino, observaram que os taquizoítas começavam a desaparecer do pulmão entre o 14° e o 16° DPI.

Com relação aos cistos do *Toxoplasma*, verificou-se que estes foram facilmente observados no cérebro a partir do 13° DPI, na maioria dos camundongos. DUBEY & FRENKEL (1973), utili-

zando a cepa M7741, encontraram os cistos no cérebro dos camundongos, principalmente durante a 3ª semana de infecção; já com a cepa GT-1, DUBEY (1980) observou que a maioria dos camundongos morreu antes que os cistos pudessem ser encontrados nos cérebros e, mesmo naqueles camundongos que morreram tardiamente, entre o 21º e o 30º DPI, não foram observados cistos no cérebro.

A virulência de uma determinada cepa de *Toxoplasma* pode ser aumentada por repetidas passagens em camundongos (DUBEY, 1977). Nas passagens realizadas em camundongos, a partir do isolamento de órgãos de galinha, verificou-se uma diminuição da média dos dias da morte, de 18 dias na primeira passagem para 10,8 dias na quinta passagem, assim como uma diminuição na formação de cistos nas duas últimas passagens.

O encontro de lesões histológicas sugestivas de toxoplasmose (BEVERLEY, 1976) nos camundongos examinados, aliados à presença do parasito, seja extracelularmente ou intracelularmente, confirmam o diagnóstico de toxoplasmose. O achado histopatológico mais constante foi um quadro de pneumonia intersticial difusa. FRENKEL (1973) também descreveu quadro semelhante, verificando que após inoculação subcutânea do *T. gondii*, o parasito se dissemina, atinge os pulmões, resultando em pneumonia significativa e finalmente acomete praticamente todos os órgãos, podendo ser fatal.

Embora as dimensões dos taquizoítas (3,7 a 6,2 x 1,2 a 3,2 um) tenham sido obtidas através do uso do microscópio óptico, elas não divergem em muito daquelas descritas por SCHOL-

TYSECK & PIEKARSKI (1965) utilizando o microscópio eletrônico e que foram de 3,5 a 7,0 x 2,0 a 4,0 um.

Verificou-se uma diferença entre o tamanho dos cistos nos esfregaços ($28,1 \pm 7,48$ x $26,3 \pm 7,74$ um) e nos cortes histológicos ($12,0 \pm 4,21$ x $10,0 \pm 0,00$ um). No entanto, em ambos os casos, os diâmetros estiveram dentro dos limites descritos por DUBEY (1977) que refere diâmetros variando de 5 a 100 um, sem considerar a origem do material, isto é, esfregaços ou cortes histológicos.

6. CONCLUSÕES

Foi possível o isolamento do *Toxoplasma gondii* de órgãos de galinhas naturalmente infectadas na região estudada, o que sugere, indiretamente, uma importante contaminação do meio ambiente com oocistos procedentes de fezes de gatos naturalmente infectados. Com relação aos órgãos examinados, o *T. gondii* teve uma maior preferência pelo cérebro e coração.

Nos isolamentos do *T. gondii* em camundongos, o protozoário foi patogênico para estes animais, sendo fatal para a maioria deles.

A variação observada nos diâmetros das formas císticas ocorreu devido à diferença do material examinado, ou seja, esfregaços e cortes histológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APT, W. 1988. Avances en el diagnostico serologico de la toxoplasmosis. *Parasitol. Dia.*, 12:33-39.

BEVERLEY, J.K.A. 1959. Congenital transmission of toxoplasmosis through sucessive generations of mice. *Nature*, 183: 1348-1349.

BEVERLEY, J.K.A. 1974. Some aspects of Toxoplasmosis, a world wide zoonosis. In SOULSBY, E.J.L. *Parasitic Zoonoses. Clinical and Experimental Studies*. Academic Press. N. York. 402 pp.

BEVERLEY, J.K.A. 1976. Toxoplasmosis in animals. *Vet. Rec.*, 99: 123-127.

- BIANCIFIORI, F.; RONDINI, C.; GRELLONI, V. & FRESCURA, T. 1986. Avian Toxoplasmosis: Experimental infections of chicken and pigeon. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 9:337-346.
- BICKFORD, A.A. & SAUNDERS, J.R. 1966. Experimental toxoplasmosis in chickens. *Am. J. vet. Res.*, 27:308-318.
- BIERING-SORENSEN, U. 1956. Fjerkraetoxoplasmose. Om forekomsten af endemisk optraedende toxoplasmose (toxoplasmosisgallinarum) i danske honsebesaetninger. *Nord. Vet. Med.*, 8: 140-164.
- BLEWETT, D.A. & WATSON, W.A. 1984. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. III. Observations on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation of possible mechanisms of transmission. *Br. Vet. J.*, 140:54-63.
- BOCH, J. 1980. Die Toxoplasmose der Hautiere-Vorkommen, Diagnose und hygienische Bedeutung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 93:385-391.
- BOCH, J.; ROMMEL, M.; WEILAND, G.; JANITSCHKE, K. & SOMMER, R. 1966. Experimentelle *Toxoplasma*- Infektionen bei Legehennen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 79:352-356.

- BORN, W.C. 1951. Natürliche *Toxoplasma* Infektionen beim Huhn. Tierärztl. Umschau., 6:27.
- CABALLERO-SERVÍN, A. 1974. Malformaciones congêntas en *Gallus gallus* provocadas por *Toxoplasma gondii*. Rev. Inv. Salud. Pública., 34:87-94.
- CAMPBELL, R.S.F.; MARTIN, W.B. & GORDON, E.D. 1955. Toxoplasmosis as a complication of canine distemper, Vet. Rec., 67: 708-712; 716.
- CARINI, A. 1909. Reproduction expérimentale de la toxoplasmose du lapin. Bull. Soc. Path. Exot., 2:465-469.
- CHINCHILLA, M. & RUIZ, A. 1976. Cockroaches as possible transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. J. Parasitol. 62:140-142.
- CUSICK, P.K.; SELLS, D.M.; HAMILTON, D.P. & HARDENBROOK, H.J. 1974. Toxoplasmosis in two horse. J. Am. Vet. Med. Assoc., 164:77-80.
- DECOSTER, A.; DARCY, F.; CARON, A. & CAPRON, A. 1988. IgA Antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. Lancet, 2:1104-1107.

- DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; ALISON, F.; BAUDELLOT, J.; GERBEAUX, J. & LELONG, M. 1965. Étude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. Rev. Franc. Études Clin. Biol., 10:952-958.
- DORR, T.E. HIGGING, R.J.; DANGER, C.A.; MADIGAN, J.E. & WITHAM, C.L. 1984. Protozoan myeloencephalitis in horses in California. J. Am. Vet. Med. Assoc., 185:801-802.
- DUBEY, J.P. 1973. Feline Toxoplasmosis and Coccidiosis: A survey of domiciled and stray cats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 102:873-877.
- DUBEY, J.P. 1974. Effect of freezing on the infectivity of *Toxoplasma* cysts to cats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 165:534-536.
- DUBEY, J.P. 1976. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other *Coccidia* of cats and dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 169:1061-1078.
- DUBEY, J.P. 1977. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming *Coccidia* of man and animals. In KREIER, J.P. Parasitic Protozoa. Gregarines, Haemogregarines, *Coccidia*, Plasmodia and Haemoproteids. Academic Press. N. York. 3:563 pp.

- DUBEY, J.P. 1979. Direct development of enteroepithelial stages of *Toxoplasma* in the intestines of cats fed cysts. *Am. J. Vet. Res.*, 40:1634-1637.
- DUBEY, J.P. 1980. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. *Am. J. Vet. Res.*, 41:427-429.
- DUBEY, J.P. 1986a. A review of toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol.*, 19:181-223.
- DUBEY, J.P. 1986b. A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.*, 22:177-202.
- DUBEY, J.P. 1986c. Toxoplasmosis in cats. *Feline Pract.*, 16:12-26; 44-45.
- DUBEY, J.P. 1986d. Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189:166-170.
- DUBEY, J.P. 1987. *Toxoplasma gondii* cysts in placentas of experimentally infected sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 48:352-353.
- DUBEY, J.P.; DAVIS, G.W.; KOESTNER, A. & KIRYU, K. 1974. Equine encephalomyelitis due to a protozoan parasite resembling *Toxoplasma gondii*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 165:249-255.

- DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.K. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 19:155-177.
- DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.K. 1973. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J. Parasitol.*, 59:505-512.
- DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.K. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.*, 23:537-546.
- DUBEY, J.P. & JOHNSTONE, I. 1982. Fatal neonatal toxoplasmosis in cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 18:461-467.
- DUBEY, J.P.; MILLER, S.; DESMONTS, G.; THULLIEZ, P. & ANDERSON, W.R. 1986a. *Toxoplasma gondii* induced abortion in dairy goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188:159-162.
- DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. 1970a. The *Toxoplasma gondii* oocysts from cat feces. *J. Exp. Med.*, 132:636-662.
- DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. 1970b. Characterization of new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 56:447-456.

- DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. 1970c. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 157: 1767-1770.
- DUBEY, J.P.; MILLER, S.; POWELL, E.C. & ANDERSON, W.R. 1986b. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii* -induced abortions. J. Am. Vet. Med. Assoc., 188: 155-158.
- DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P.; LOPES, C.W.G.; WILLIAMS, J.F.; WILLIAMS, C.S.F. & WEINSBRODE, S.E. 1980. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissue of goats fed oocysts. Am. J. Vet. Res., 41: 1072-1076.
- DUBEY, J.P. & THULLIEZ, P. 1989. Serologic diagnosis in cat fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. J. Am. Vet. Med. Assoc., 194: 1297-1299.
- ERICHSEN, S. & HARBOE, A. 1953. Toxoplasmosis in chickens. I. An epidemic outbreak of toxoplasmosis in a chicken flock in South-eastern Norway. Acta Path. Microbiol. Scand., 33:56-71.
- FANKHAUSER, R. 1951. Toxoplasmose auch beim Huhn. Schweizer. Arch. Tierheilk. 93:823-828.

- FELDMAN, H.A. 1982. Epidemiology of *Toxoplasma* infections. *Epidemiol. Reviews*, 4:204-213.
- FOSTER, B.G.; FORREST, R.G. & BLANCO, J.K. 1969. Isolation of *Toxoplasma gondii* from naturally infected chickens. *Texas J. Sc.*, 20:323-328.
- FRENKEL, J.K. 1948. Dermal hypersensitivity to *Toxoplasma* antigens (toxoplasmins). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68:634-639.
- FRENKEL, J.K. 1956. Pathogenesis of toxoplasmosis and of infections with organisms resembling *Toxoplasma*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 64:215-251.
- FRENKEL, J.K. 1973. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In HAMMOND, D.M. & LONG, P.L. *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and Related Genera*. University Park Press. Baltimore. 482 pp.
- FRENKEL, J.K. 1974. Advances in the biology of sporozoa. *Z. Parasitenkd*, 45:125-162.
- FRENKEL, J.K. 1975. Protozoan diseases of laboratory animals. In MARCIAL-ROJAS, R.A. *Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases with Clinical Correlation*. Publishing Company. N. York. 1010 pp.

- FRENKEL, J.K. 1977. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *J. Parasitol.*, 63:611-628.
- FRENKEL, J.K. 1981. False-negative serological tests for *Toxoplasma* in birds. *J. Parasitol.*, 67:952-953.
- FRENKEL, J.K. 1986. La inmunidad en la toxoplasmosis. *Bol. Sanit. Panam.*, 100:283-298.
- FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. 1975. *Hammondia hammondii* gen. nov. sp. nov., from domestic cats, a new coccidian related to *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. *Z. Parasitenkd.*, 46:3-12.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. & MILLER, N.L. 1969. *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science*, 164:432-433.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. & MILLER, N.L. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167:893-896.
- FRENKEL, J.K. & RUIZ, A. 1980. Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:1167-1180.

- FRENKEL, J.K. & RUIZ, A. 1981. Endemicity of toxoplasmosis in Costa Rica: transmission between cats, soil, intermediate hosts and humans. *Am. J. Epidemiol.*, 113:254-269.
- FRENKEL, J.K.; RUIZ, A. & CHINCHILLA, M. 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24:439-443.
- GEISSLER, H. 1952. Toxoplasmose bei Hühnern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 59:166-168.
- GEISSLER, H. 1955. Untersuchungen über die Toxoplasmose beim Huhn unter besonderer Berücksichtigung der Serodiagnostik. *Zbl. Vet. Med.*, 2:251-283.
- GIBSON, G.L. & EYLES, D.E. 1957. *Toxoplasma* infections in animals associated with a case of human congenital toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 6: 990-1000.
- GUSTAFSSON, K.; UGGLA, A.; SVENSSON, T. & SJÖLAND, L. 1988. Detection of *Toxoplasma gondii* in liver tissue sections from brown hares (*Lepus europaeus*, P.) and mountain hares (*Lepus timidus*, L.) using peroxidase anti-peroxidase (PAP) technique as a complement to conventional histopathology. *J. Vet. Med.*, 35:402-407.

- HARBOE, A. & ERICHSEN, S. 1954. Toxoplasmosis in chickens. 3-Attempts to provoke a systemic disease in chickens by infection with a chicken strain and a human strain of *Toxoplasma*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 35:495-502.
- HARBOE, A. & ERICHSEN, S. 1955. The immunologic response of chickens to experimental infection with *Toxoplasma*. Nord. Vet. Med., 7:41-51.
- HARBOE, A. & REENAS, R. 1957. The complement fixation inhibition test with sera from chickens experimentally infected with *Toxoplasma*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 41:511-516.
- HEPDING, L. 1939. Ueber Toxoplasmen (*Toxoplasma gallinarum* n. sp.) in der Retina eines Huhnes und über deren Beziehung zur Hühnerlähmung. Z. Infektkr. Haustiere, 55:109-116.
- HUTCHISON, W.M. 1965. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature, 206:961-962.
- HUTCHISON, W.M. 1967. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61:80-89.
- HUTCHISON, W.M.; DUNACHIE, J.F.; SIIM, J.C. & WORK, K. 1970. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. Brit. Med. J., 1:142-144.

JACOBS, L. & JONES, F.E. 1950. The parasitemia in experimental toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 87:78-89.

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

JACOBS, L.; MELTON, M.L. & STANLEY, A.M. 1962. The isolation of *Toxoplasma gondii* from the ovaries and oviducts of naturally infected hens. *J. Parasitol.*, 48:38.

JACOBS, L.; REMINGTON, J.S. & MELTON, M.L. 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 46:11-21.

JONES, F.E.; MELTON, M.L.; LUNDE, M.N.; EYLES, D.E. & JACOBS, L. 1959. Experimental toxoplasmosis in chickens. *J. Parasitol.*, 45:31-37.

KAMEI, K.; SATO, K. & TSUNEMATSU, Y. 1976. A strain of mouse highly susceptible to *Toxoplasma*. *J. Parasitol.*, 62:714.

KEAN, B.H.; MOTT, K.E. & RUSSEL, A.J. 1978. *Tropical Medicine and Parasitology. Classic Investigations.* Cornell. Univ. Press. N. York. Vol I. 284 pp.

- KINJO, T. 1961. Studies on experimental toxoplasmosis in chickens. *Jap. J. Vet. Res.*, 9:125-126.
- KULASIRI, C. 1965. Infection of the chicken with avirulent *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.*, 17:65-68.
- KULASIRI, C. & PRASAD, H. 1961. A note on the behaviour of an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* in some B-vitamin deficient chicks. *Parasitology*, 51:265-267.
- LAVERAN, A. & MARULLAZ, M. 1913. Recherches experimentales sur le *Toxoplasma gondii*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 6:460-468.
- LEVADITI, C.; SANCHIS-BAYARRI, V.; LÉPINE, P. & SCHOEN, R. 1929. Étude sur l'encéphalo-myélite provoquée par le *Toxoplasma cuniculi*. *Ann. Inst. Pasteur.*, 43:673-736.
- LEVINE, N.D. 1973a. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. Minneapolis, Burgess Pub. Co. 406 pp.
- LEVINE, N.D. 1973b. Introduction, history and taxonomy. In HAMMOND, D.M. & LONG, P.L. *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and Related Genera*. University Park Press. Baltimore. 482 pp.

- LEVINE, N.D. 1977. Taxonomy of *Toxoplasma*. J. Protozool., 24:36-41.
- 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.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J. & WALLACE, F.G. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozool., 27:37-58.
- MANWELL, R.D. 1941. Avian toxoplasmosis with the invasion of the erythrocytes. J. Parasitol., 27:245-251.
- MANWELL, R.D.; COULSTON, F.; BINCKLEY, E.C. & JONES, V.P. 1945. Mammalian and avian *Toxoplasma*. J. Infect. Dis., 76:1-14.
- MANWELL, R.D. & DROBECK, H.P. 1951. Mammalian toxoplasmosis in birds. Exp. Parasitol., 1:83-93.
- MARKUS, M.B. 1974. Earthworms and coccidian oocysts. Annals Trop. Med. Parasitol., 68:247-248.
- MEIER, H.; HOLZWORTH, J. & GRIFFITHS, R.C. 1957. Toxoplasmosis in the cat-fourteen cases. J. Am. Vet. Med. Assoc., 131:395-414.

- MELLO, U. 1910. Un cas de toxoplasmose du chien observé à Turin. Bull. Soc. Pathol. Exot., 3:359-363.
- MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. 1972. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and in birds. J. Parasitol., 58:928-937.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. Compt. Rend. Acad. Sci., 147:763-766.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. 1909. Sur un nouveau protozoaire du gondii. Compt. Rend. Acad. Sci., 148:369-372.
- NOBREGA, P. & REIS, J. 1942. Identidade dos toxoplasmas de aves e de mamíferos. Arq. Inst. Biol. São Paulo, 13 :21-28.
- NOBREGA, P.; TRAPP, E.E. & GIOVANNONI, M. 1954. Toxoplasmosis en gallinas. Rev. Vet. Milit., 2:209-210.
- NOBREGA, P.; TRAPP, E.E. & GIOVANNONI, M. 1955. Toxoplasmose espontanea de galinha. Arq. Inst. Biol. São Paulo, 22:43-49.
- NURSE, G.H. & LENGHAUS, C. 1986. An outbreak of *Toxoplasma gondii* abortion, mummification and perinatal death in goats. Austral. Vet. J., 63:27-29.

- PINKERTON, H. & WEINMAN, D. 1940. *Toxoplasma* infection in man. *Arch. Path.*, 30:374-392.
- RUCHMAN, I. & JOHNSMANN, R.J. 1948. Biological properties of a strain of *Toxoplasma* recovered from a fatal case of congenital toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med.*, 28:687-695.
- RUIZ, A. & FRENKEL, J.K. 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:1161-1166.
- RUIZ, A.; FRENKEL, J.K. & CERDAS, L. 1973. Isolation of *Toxoplasma* from soil. *J. Parasitol.*, 59:204-206.
- SABIN, A.B. 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Amer. Med. Ass.*, 116:801-807.
- SABIN, A.B. & FELDMAN, H.A. 1948. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*) *Science*, 108:660-663.
- SCHOLTYSECK, E. & PIEKARSKI, G. 1965. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Merozoiten von Eimerien (*Eimeria perforans* und *E. stiedae*) und *Toxoplasma gondii*. Zur systematischen Stellung von *T. gondii*. *Z. Parasitenk.* 26:91-115.

- SCHULTE, F. 1954. Toxoplasrose-Encephalites beim Geflügel. Deut. Tierärztl. Wschr., 61:482-484.
- SHEFFIED, H.G. & MELTON, M.L. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol., 54:209-226.
- SHEFFIELD, H.G. & MELTON, M.L. 1970. *Toxoplasma gondii*: The oocysts, sporozoite, and infection of cultured cells. Science, 167:892-893.
- SIIM, J.C. 1952. Studies on acquired toxoplasmosis. II - Report of a case with pathological changes in a lymph node removed at biopsy. Acta Path. Microbiol. Scand., 30:104-108.
- SIIM, J.C.; BIERING-SORENSEN, U. & MOLLER, T. 1963. Toxoplasmosis in domestic animals. Adv. Anc. Vet. Sci., 8:335-429.
- SIMITCH, T.; BORDJOCHKI, A.; PETROVITCH, Z.; TOMANOVITCH, B. & SAVIN, Z. 1961a. La toxoplasrose des oiseaux. I - L'infection naturelle de la volaille domestique par *Toxoplasma gondii* en Yougoslavie. Arch. Inst. Pasteur. Algér., 39:135-139.
- SIMITCH, T.; SAVIN, Z.; BORDJOCHKI, A.; PETROVITCH, Z. & TOMANOVITCH, B. 1961b. L'infection de la poule avec *Toxoplasma gondii* par le voie buccale. Note preliminaire. Arch. Inst. Pasteur. Algér., 39:441-447.

- SOUZA, W.J.S. 1986. Aspectos soroepidemiológicos da *toxoplasmo-*
se em escolares no Rio de Janeiro. Tese UFRRJ. 78 pp.
- SPARAPANI, G.C. 1950. La toxoplasmosi dei polli. *Pediatria*, 58:
411-414.
- SPLENDRE, A. 1908. Un nuovo protozoa parassita de'conigli in-
contrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricor-
da in molti punti il kala-azar dell'uomo. *Rev. Soc. Sci. São*
Paulo, 3:109-112.
- SPLENDRE, A. 1909. Sur un nouveau protozoaire parasite du la-
pin. Deuxième note préliminaire. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*,
2:462-465.
- UGGLA, A.; SJÖLAND, L. & DUBEY, J.P. 1987. Immunohistochemical
diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes
of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 48:348-351.
- VOLLBRECHTSHAUSEN, R. 1954. Vergleichende Untersuchungen über
den SABIN-FELDMAN-Farbttest und die Toxoplasma-Komplemen-
t-Bindungsreaktion nach Westphal in Tierversuchen. *Zschr. Tro-*
penmed. Parasitol., 5:401-422.
- WALLACE, G.D. 1969. Serologic and epidemiologic observations
on toxoplasmosis on three Pacific atolls. *Am. J. Epidemiol.*
90:103-111.

- WALLACE, G.D. 1971. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by filth-flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20:411-413.
- WALLACE, G.D. 1972. Experimental transmission *Toxoplasma gondii* by cockroaches. *J. Inf. Dis.*, 126:545-547.
- WALLACE, G.D. 1973a. The role of the cat in the natural history of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22:313-322.
- WALLACE, G.D. 1973b. Intermediate and transport host in the natural history of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22:456-464.
- WALLACE, G.D.; MARSHALL, L. & MARSHALL, M. 1972. Cats, rats and toxoplasmosis on a small Pacific island. *Am. J. Epidemiol.*, 95:475-482.
- WEILAND, G. & KÜHN, D. 1970. Experimentelle *Toxoplasma*-Infektionen bei der Katze. II - Entwicklungsstadien des Parasiten in Darm. *Berl. & Münch. Tierärztl. Wschr.*, 83:128-132.
- WOLF, A. & COWEN, D. 1937. Granulomatous encephalomyelitis due to an Eucephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull. Neurol. Inst. N. Y.*, 6: 306-335.

WOLF, A.; COWEN, D. & PAIGE, B. 1939. Human toxoplasmosis: Occurrence in infants as an encephalomyelitis: verification by transmission to animals. *Science*, 89:226-227.

WOLF, A.; COWEN, D. & PAIGE, B.H. 1940. Toxoplasmic encephalomyelitis. IV - Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. *J. Exper. Med.*, 71:187-214.

WOLFSON, F. 1941. Mammalian *Toxoplasma* in erythrocytes of canaries, ducks, and duck embryos. *Am. J. Trop. Med.*, 21:653-658.

YILMAZ, M.S. & HOPKINS, H.S. 1972. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* , 58:936-939.