

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**SEROPREVALÊNCIA DE INFEÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM ANIMAIS
DOMÉSTICOS DE SÃO TOMÉ**

-Versão Definitiva-

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

DANIELA CRUZ LOPES PEREIRA

Orientadora:

Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes (DVM, PhD)



Vila Real, novembro 2018

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**SEROPREVALÊNCIA DE INFEÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM ANIMAIS
DOMÉSTICOS DE SÃO TOMÉ**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

DANIELA CRUZ LOPES PEREIRA

Orientadora:

Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes (DVM, PhD)



Vila Real, novembro 2018

DECLARAÇÃO

Nome: Daniela Cruz Lopes Pereira

Endereço eletrónico: danielacr.lp_p@hotmail.com

Designação do mestrado: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Título: “Seroprevalência de infeção por *Toxoplasma gondii* em animais domésticos de São Tomé”

Orientadora: Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes

Ano de conclusão: 2018

Declaro que a presente dissertação de mestrado, submetida à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, foi elaborada sob a orientação da Sra. Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes. O presente trabalho é resultado da minha investigação, pesquisa e trabalho e das indicações da minha orientadora. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão mencionadas devidamente no texto e nas referências.

Vila Real, 2018

Daniela Cruz Lopes Pereira

AGRADECIMENTOS

Após concluir o estágio e escrever esta dissertação, gostaria de expressar o meu sincero obrigado a todos os que de uma forma ou de outra contribuíram para o resultado final, bem como para o enriquecimento do meu conhecimento e toda a ajuda indispensável à realização do mesmo.

Um agradecimento muito especial à minha orientadora da dissertação, Sra. Professora Doutora Ana Patrícia Lopes, por ter aceitado em primeiro lugar ser minha orientadora de mestrado e por dedicar muito do seu tempo ao apoio e na realização do mesmo, bem como por ter despertado em mim o gosto pela Parasitologia. Os objetivos propostos não teriam sido atingidos sem a sua determinação e empenho.

Ao Sr. Professor Doutor Luís Cardoso, pela disponibilidade, incentivo e ajuda prestada na análise estatística da minha dissertação.

Ao Dr. Alfredo da Mata, pela disponibilidade e pela oportunidade da realização do estágio em São Tomé.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório Central de Diagnóstico Veterinário de São Tomé, técnicos Sr. Joseldo Andrade e Sra. Fátima Vera Cruz, engenheira zootécnica Sra. Toyamara Vera Cruz, mestre em biologia Sra. Dra. Alzira Garcês e a Sra. Dra. Helda Neto, por terem sido incansáveis na ajuda de recolha de amostras, disponibilização dos meios necessários para a realização da parte prática desta dissertação, ensinamentos e pela simpatia e amizade.

Gostaria ainda de agradecer à UTAD, na pessoa do seu Magnífico Reitor, Professor Doutor António Fontainhas Fernandes, à Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, ao Departamento de Ciências Veterinárias, nomeadamente aos seus docentes e funcionários que desde o início do meu percurso académico me acompanharam.

Aos meus pais, pelo apoio emocional e financeiro que me prestaram ao longo desta caminhada e na concretização de um sonho.

Aos meus amigos de coração que a vida académica me ofereceu, muito obrigada.

Aos meus animais, em especial à Mel e ao Odie, que me deram todo o amor, dedicação e gosto pela medicina veterinária.

RESUMO

A toxoplasmose, uma das zoonoses mais difundidas no mundo, é causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário parasita intracelular obrigatório que tem os felídeos como únicos hospedeiros definitivos e que pode afetar a maior parte dos animais homeotérmicos. A infecção por este protozoário é uma importante causa de abortos e mortalidade neonatal em várias espécies incluindo caprinos, ovinos e seres humanos. Nos humanos é ainda importante salientar o elevado impacto socioeconómico em termos de saúde pública, com custos elevados de tratamento, sofrimento de doentes e consequências como deficiência mental, cegueira ou mesmo morte.

Uma vez que a República Democrática de São Tomé e Príncipe representa uma área geográfica pouco estudada, o principal objetivo deste trabalho final de curso foi determinar a seroprevalência de infecção por *T. gondii* em animais domésticos de São Tomé.

Soros de 346 animais foram testados, entre agosto a outubro de 2017, para a pesquisa de imunoglobulinas (Ig) G anti-*T. gondii* através do teste de aglutinação modificado (“modified agglutination test” – MAT), tendo sido obtida uma seroprevalência geral de infecção de 55,8% (193/346). Dos 193 animais seropositivos, 6,7% (13/193) eram bovinos, 34,7% (67/193) eram ovinos, 35,2% (68/193) eram caprinos e, 23,3% (45/193) eram suínos.

Verificou-se a existência de uma seroprevalência de infecção de 27,1% (13/48) em bovinos, 68,4% (67/98) em ovinos, 70,1% (68/97) em caprinos, 43,7% (45/103) em suínos.

Os resultados do presente estudo sugerem uma elevada exposição dos animais domésticos de São Tomé às formas infetantes de *T. gondii*, realçando a importância da necessidade de realização de mais estudos sobre a infecção por este protozoário em outros hospedeiros incluindo o cão e o gato.

Palavras-chave: bovinos; caprinos; MAT; ovinos; São Tomé; suínos; seroprevalência; *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Toxoplasmosis, one of the most widespread zoonosis in the world, is caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan parasite that can infect most of warm blooded animals, with domestic and wild felids being it's unique and definitive hosts. *T. gondii* infection may lead to abortion in several species including sheep, goats and humans. In humans, it is still important to emphasize the high socio-economic impact in terms of public health, with high costs of treatment, patient suffering and consequences such as mental deficiency, blindness or even death.

Since the Democratic Republic of São Tomé and Príncipe represents a poorly studied area, the main objective of this work was to determine the seroprevalence of infection by *T. gondii* in domestic animals from São Tomé.

Sera from 346 animals were tested for the presence of immunoglobulins (Ig) G to *T. gondii*, by using the modified agglutination test (MAT), with an overall seroprevalence of 55.8% (193/346). Out of the 193 seropositive animals, 6.7% (13/193) were cattle, 34.7% (67/193) were sheep, 35.2% (68/193) were goats and 23.3% (45/193) were pigs.

According to the animal species 27.1% (13/48) of cattle, 68.4% (67/98) of sheep, 70.1% (68/97) of goats and 43.7% (45/103) of pigs were found to be infected with *T. gondii*.

The results of the present study suggest a high exposure of the domestic animals of São Tomé to the infective forms of *T. gondii*, emphasizing the importance of further studies on the infection by this protozoan in other hosts including the dog and the cat.

Key words: cattle; goats; MAT; São Tomé; pigs; seroprevalence; sheep; *Toxoplasma gondii*.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS OU SIGLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
PARTE I – Revisão da literatura científica	
1. INTRODUÇÃO	1
2. O PARASITA <i>TOXOPLASMA GONDII</i>.....	2
2.1. Referência histórica.....	2
2.1.1. Classificação taxonómica.....	3
2.2. Morfologia do parasita.....	3
2.3. CICLO BIOLÓGICO	6
2.3.1. Transmissão	6
2.3.2. Fase extraintestinal.....	7
2.3.3. Fase enteroepitelial.....	8
2.3.4. Eliminação e esporulação de oocistos	10
2.4. Variabilidade genética	10
3. PATOGENIA E RESPOSTAS IMUNITÁRIAS	12
3.1. Imunidade celular	13
3.2. Imunidade humoral.....	14
4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	15
4.1. Métodos diretos	15
4.1.1. Citologia e imuno-histoquímica	15

4.1.2.	Exame coprológico	16
4.1.3.	Reação em cadeia da polimerase	16
4.1.4.	Bioensaio	17
4.2.	Métodos indiretos	17
4.2.1.	Teste de lise.....	17
4.2.2.	Teste da imunofluorescência indireta	18
4.2.3.	Ensaio imunoenzimático	18
4.2.4.	Teste de aglutinação modificado	18
4.2.5.	Outros testes de aglutinação	19
5.	INFEÇÃO POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM ANIMAIS	19
5.1.	Infeção por <i>Toxoplasma gondii</i> no hospedeiro definitivo	19
5.1.1.	Distribuição e prevalência	19
5.1.2.	Quadro clínico e lesional	21
5.2.	Infeção por <i>Toxoplasma gondii</i> em bovinos.....	22
5.2.1.	Distribuição e prevalência	22
5.2.2.	Quadro clínico e lesional	23
5.3.	Infeção por <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos e caprinos	24
5.3.1.	Distribuição e prevalência	24
5.3.2.	Quadro clínico e lesional	27
5.4.	Infeção por <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos.....	29
5.4.1.	Distribuição e prevalência	29
5.4.2.	Quadro clínico e lesional	30
5.5.	Infeção por <i>Toxoplasma gondii</i> em outras espécies animais	31
5.5.1.	Distribuição e prevalência	31
5.5.2.	Quadro clínico e lesional	33
6.	INFEÇÃO POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM SERES HUMANOS.....	34
6.1.	Distribuição e prevalência.....	34
6.2.	Quadro clínico e lesional.....	36
7.	TRATAMENTO	37
8.	PREVENÇÃO E CONTROLO	38
9.	VACINAÇÃO.....	41

PARTE II – Componente experimental

1. INTRODUÇÃO	45
2. OBJETIVOS.....	46
2.1. Objetivo geral.....	46
2.2. Objetivos específicos	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. Caracterização da área de estudo	46
3.2. Ficha epidemiológica.....	49
3.3. Contenção dos animais.....	51
3.4. Animais amostrados.....	52
3.4.1. Amostras de sangue e procedimento.....	52
3.5. Exame serológico	53
3.5.1. Material.....	53
3.5.1.1. Material.....	53
3.5.1.2. Metodologia laboratorial.....	56
3.5.2. Leitura e interpretação dos resultados.....	58
3.6. Análise estatística.....	60
4. RESULTADOS	61
4.1. Distribuição dos animais incluídos no estudo	61
4.1.1. Distribuição dos bovinos incluídos no estudo	61
4.1.2. Distribuição dos ovinos incluídos no estudo	64
4.1.3. Distribuição dos caprinos incluídos no estudo	66
4.1.4. Distribuição dos suínos incluídos no estudo	68
4.2. Seroprevalência de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> nos animais incluídos no estudo	71
4.2.1. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em bovinos	72
4.2.2. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em ovinos	77
4.2.3. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em caprinos.....	81
4.2.4. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em suínos.....	86
4.2.5. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> nas várias espécies em estudo quando comparadas aos pares	91
4.3. Fatores de risco	92
5. DISCUSSÃO	95

6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	101
Bibliografia	103
ANEXO I – Quadro epidemiológico	115
ANEXO II - Autorização da Direção de Pecuária de São Tomé e Príncipe	116

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS OU SIGLAS

IL	interleucina
2-ME	2-beta-mercaptoetanol
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ag	antigénio
ARN	ácido ribonucleico
CD	aglomerado de diferenciação (do inglês “cluster of differentiation”)
CPP	com procriação prévia
DAT	teste de aglutinação direta (do inglês “direct agglutination test”)
DT	teste de lise (do inglês “dye test”)
ELFA	teste imunoenzimático por fluorescência (do inglês “enzyme linked fluorescent assay”)
ELISA	ensaio imunoenzimático (do inglês “enzyme linked immunosorbent assay”)
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês “The Food and Agriculture Organization”)
GRA	antigénio de grânulo denso (do inglês “dense granule antigen”)
HD	hospedeiro definitivo
HI	hospedeiro intermediário
IAT	teste de aglutinação indireta (do inglês “indirect agglutination test”)

IFAT	teste de imunofluorescência indireta (do inglês “indirect fluorescent antibody test”)
IFN-γ	interferão gama (do inglês “interferon gamma”)
Ig	imunoglobulina
IHAT	teste de hemaglutinação indireta (do inglês “indirect hemagglutination test”)
LAT	teste de aglutinação em látex (do inglês “latex agglutination test”)
mARN	ácido ribonucleico mensageiro
MAT	teste de aglutinação modificado (do inglês “modified agglutination test”)
MHC	complexo principal de histocompatibilidade (do inglês “major histocompatibility complex”)
MIC	antígenos de micronema (do inglês “microneme antigens”)
NE	não especificado
NK	células exterminadoras naturais (do inglês “natural killer cells”)
OD	densidade ótica (do inglês “optical density”)
OR	razão de produtos cruzados (do inglês “odds ratio”)
<i>p</i>	valor de probabilidade
PAS	ácido periódico de Schiff (do inglês “periodic acid schiff”)
PBS	solução tampão de fosfato (do inglês “phosphate buffered solution”)

PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês “polymerase chain reaction”)
RDSTP	República Democrática de São Tomé e Príncipe
ROP	antigénio de roptrias (do inglês “rhoptry antigen”)
rpm	rotações por minuto
SAG	antigénio de superfície (do inglês “surface antigen”)
SED	sem estado reprodutivo definido
SIDA	síndrome de imunodeficiência adquirida
SNC	sistema nervoso central
SPCA	Society for the Prevention of Cruelty to Animals
SPP	sem procriação prévia
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa (do inglês “ tumor necrosis factor alpha”)
UNFPA	Fundo de População das Nações Unidas (do inglês “United Nations Population Fund”)
VIH	vírus da imunodeficiência humana
μm	micrómetro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (cabeça de setas). Adaptado de Dubey et al. (1998).....	3
Figura 2. Bradizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> . Bradizoítos (setas). Adaptado de Dubey et al. (1998).....	4
Figura 3. Representação esquemática de taquizoíto (à esquerda) e bradizoíto (à direita) de <i>T. gondii</i> . Adaptado de Dubey et al. (1998).	5
Figura 4. Oocistos de <i>T. gondii</i> (A) Oocisto não esporulado. (B) Oocisto esporulado com dois esporocistos. Quatro esporozoítos (setas) são visíveis num único esporocisto. Adaptado de Dubey et al. (1998).....	6
Figura 5. Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> . Assinalado a vermelho o início do ciclo nos hospedeiros intermédios. Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012).	7
Figura 6. Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> : endodiogenia. Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012).....	8
Figura 7. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> no hospedeiro definitivo. Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012).	9
Figura 8. Desenvolvimento coccidiano de <i>Toxoplasma gondii</i> no gato. (a-c) Micrografias de luz através do intestino delgado do gato, mostrando vários estádios nos enterócitos (setas). Adaptado de Ferguson (2009).....	9
Figura 9. Localização geográfica de São Tomé e Príncipe (Fonte: https://olimpiadas.uol.com.br/2008/paises-participantes/sao-tome-e-principe.jhtm , acesso a 10 de maio de 2018).	47
Figura 10. Mapa da Ilha de São Tomé (Fonte: https://arleciosoares13.wordpress.com , acesso a 28 de setembro de 2017)	48
Figura 11. Mapa da RDSTP, delimitação dos distritos da ilha de São Tomé (Adaptada de www.mapsofworld.com , acesso a 28 de setembro de 2017).	49
Figura 12. Explorações pecuárias de São Tomé, com acesso ao exterior. Original.....	50
Figura 13. Contenção em bovinos na manga. Zona norte de São Tomé. Original.	51
Figura 14. Contenção manual em caprino. Zona norte de São Tomé. Original.....	51
Figura 15. Recolha de sangue em bovino. São Tomé. Original.	52
Figura 16. Toxo-Screen DA [®] (bioMérieux). Original.....	53
Figura 17. Reagentes incluídos no teste comercial Toxo-Screen DA [®] (bioMérieux). Original.:	54
Figura 18. Micropipetas. Original.	55
Figura 19. Agitador de placa. Original.....	55
Figura 20. Espelho de aumento. Original.....	55

Figura 21. Frasco de 2-ME, protegido com papel de alumínio. Original.....	56
Figura 22. Pipetagem de PBS com micropipeta multicanal de oito pontas. Original.	57
Figura 23. Placas de diluição no agitador de placa. Original.....	57
Figura 24. Observação dos resultados, com o uso do espelho de aumento. Original.	59
Figura 25. Resultados controlo: (+) controlo positivo, (-) controlo negativo, (A) antigénio. Original.....	59
Figura 26. Resultados positivos. Original.....	59
Figura 27. Resultados negativos. Original.	60

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição do número total de animais incluídos no estudo de acordo com a espécie.....	61
Gráfico 2. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com o género.....	61
Gráfico 3. Distribuição dos bovinos fêmeas em estudo de acordo com o estado reprodutivo.	62
Gráfico 4. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com a idade.	63
Gráfico 5. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com a raça.....	63
Gráfico 6. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com a área geográfica.	64
Gráfico 7. Distribuição dos ovinos em estudo de acordo com o género.....	64
Gráfico 8. Distribuição dos ovinos acordo com o estado reprodutivo das fêmeas.....	65
Gráfico 9. Distribuição dos ovinos em estudo de acordo com a idade.....	65
Gráfico 10. Distribuição dos ovinos em estudo de acordo com a área geográfica.	66
Gráfico 11. Distribuição dos caprinos em estudo de acordo com o género.....	66
Gráfico 12. Distribuição dos caprinos acordo com o estado reprodutivo das fêmeas.	67
Gráfico 13. Distribuição dos caprinos em estudo de acordo com a idade.....	67
Gráfico 14. Distribuição dos caprinos em estudo de acordo com a área geográfica.....	68
Gráfico 15. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com o género.	68
Gráfico 16. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com a idade.....	69
Gráfico 17. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com a raça.....	69
Gráfico 18. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com a área geográfica.	70
Gráfico 19. Seroprevalência de infeção por <i>T. gondii</i> em bovinos, ovinos, caprinos e suínos de São Tomé.....	71
Gráfico 20. Seroprevalência de infeção por <i>T. gondii</i> nos bovinos fêmeas.....	72
Gráfico 21. Seroprevalência de infeção por <i>T. gondii</i> nos bovinos machos.	73
Gráfico 22. Distribuição dos bovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infeção por <i>T. gondii</i> em jovens.	73
Gráfico 23. Distribuição dos bovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infeção por <i>T. gondii</i> em adultos.	74
Gráfico 24. Seroprevalência por título (MAT 100 e MAT 400), em bovinos de raça cruzada.	74
Gráfico 25. Seroprevalência de infeção por <i>T. gondii</i> em bovinos da zona norte de acordo com o título (MAT 100 e MAT 400).....	75
Gráfico 26. Seroprevalência por título em bovinos na zona sul.	75
Gráfico 27. Seroprevalência de infeção por <i>T. gondii</i> nos ovinos fêmeas.....	77

Gráfico 28. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> nos ovinos machos.	78
Gráfico 29. Distribuição dos ovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em jovens.	78
Gráfico 30. Distribuição dos ovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em adultos.	79
Gráfico 31. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em ovinos, na zona norte.	79
Gráfico 32. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em ovinos, na zona centro.	80
Gráfico 33. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em ovinos, na zona sul.	80
Gráfico 34. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> nos caprinos fêmeas.	82
Gráfico 35. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> nos caprinos machos.	82
Gráfico 36. Distribuição dos caprinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em jovens.	83
Gráfico 37. Distribuição dos caprinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em adultos.	83
Gráfico 38. Seroprevalência por título (MAT 400) em caprinos, na zona norte.	84
Gráfico 39. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em caprinos, na zona centro.	84
Gráfico 40. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em caprinos, na zona sul.	85
Gráfico 41. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> nos suínos fêmeas.	86
Gráfico 42. Seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> nos suínos machos.	86
Gráfico 43. Distribuição dos suínos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em jovens.	87
Gráfico 44. Distribuição dos suínos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por <i>T. gondii</i> em adultos.	88
Gráfico 45. Seroprevalência por título (MAT 100 e MAT 400), em suínos raça Large White.	88
Gráfico 46. Seroprevalência por título (MAT 100 e MAT 400), em suínos de raça cruzada.	89
Gráfico 47. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em suínos, na zona norte.	89
Gráfico 48. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em suínos, na zona centro.	90
Gráfico 49. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em suínos, na zona sul.	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Seroprevalência mundial de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos.....	21
Tabela 2. Seroprevalência mundial de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em bovinos.....	23
Tabela 3. Seroprevalência mundial de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos.....	25
Tabela 4. Seroprevalência mundial de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em caprinos.....	27
Tabela 5. Seroprevalência mundial de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos.....	30
Tabela 6. Seroprevalência mundial de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em seres humanos	35
Tabela 7. Seroprevalência de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em bovinos de São Tomé de acordo com género, idade, raça e área geográfica.....	76
Tabela 8. Seroprevalência de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos de São Tomé de acordo com género, idade e área geográfica.	81
Tabela 9. Seroprevalência de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em caprinos de São Tomé de acordo com género, idade e área geográfica.	85
Tabela 10. Seroprevalência de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos de São Tomé de acordo com género, idade, raça e área geográfica.....	91
Tabela 11. Valores de probabilidade (p) observados após comparação aos pares entre as espécies, de acordo com o limiar de positividade estabelecido	92
Tabela 12. Valores de probabilidade (p) observados após comparação aos pares entre as espécies, de acordo com título > ou = 400	92
Tabela 13. Fatores de risco para a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em bovinos, ovinos e caprinos de São Tomé por regressão logística múltipla (limiar de positividade).	93
Tabela 14. Fatores de risco para a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em bovinos, ovinos e caprinos de São Tomé por regressão logística múltipla (título 400).....	94

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a interação entre a população humana e o ecossistema, associado à globalização e às variações climáticas e antropogénicas, conduziu a uma perturbação ambiental, com impacto nos agentes parasitários (Patz *et al.*, 2000; Brooks e Hoberg, 2007; Weaver *et al.* 2010).

Embora os pontos de inflexão representados pela população humana em expansão, o desenvolvimento da agricultura e a domesticação de animais tenham influenciado diretamente a ocorrência de parasitas em humanos, muitas associações de hospedeiros e parasitas existentes têm origens consideravelmente mais profundas que se estendem para o Plioceno e Pleistoceno (Hoberg e Brooks, 2013).

Toxoplasma gondii é um parasita protozoário heteroxeno, conhecido por infetar animais homeotérmicos, incluindo humanos e que se estima que infete um terço da população humana mundial (Jackson e Hutchison, 1989; Dubey, 1998; Halonen e Weiss, 2013).

A prevalência de infeção por *T. gondii* varia de acordo com o estilo de vida dos hospedeiros definitivos, como o gato, sendo, geralmente mais elevado em gatos selvagens, em busca de alimento, do que em gatos domésticos (DeFeo *et al.*, 2002). Devido ao ambiente compartilhado por diversas espécies em São Tomé, a infeção pelo protozoário nos hospedeiros definitivos pode representar um indicador epidemiológico do seu risco de transmissão para os hospedeiros domésticos e o próprio homem (Dubey e Beattie, 1988; Tenter *et al.*, 2000).

Assim, *T. gondii* possui especial interesse em animais domésticos, por ser uma das principais causas de aborto infeccioso e mortalidade neonatal em ovino de países como a Nova Zelândia, Austrália e Estados Unidos, mas também em caprinos (Dubey e Beattie, 1988); por ser transmitido frequentemente a suínos, provocando elevadas perdas económicas (Okamoto *et al.*, 1998).

Este protozoário está associado à infeção congénita e ao aborto em humanos. Adicionalmente, é um agente patogénico com tropismo para o sistema nervoso central, podendo causar encefalite com graves sequelas e infeções sistémicas nos indivíduos imunodeprimidos (Halonen e Weiss, 2013).

Na década de 1980, surgiu como uma importante infeção oportunista no contexto da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), provocando encefalite grave e

potencialmente fatal (Luft e Remington, 1992). A toxoplasmose também é uma doença clinicamente importante em outros indivíduos imunodeprimidos, como pacientes submetidos à quimioterapia ou ao transplante de órgãos (Halonen e Weiss, 2013). Os indivíduos imunocompetentes são geralmente assintomáticos e mantêm a infecção para toda a vida. No entanto, estudos recentes sugerem que essas infecções assintomáticas podem ter efeitos sobre o comportamento e outros processos fisiológicos (Halonen e Weiss, 2013).

2. O PARASITA *TOXOPLASMA GONDII*

2.1. Referência histórica

Toxoplasma gondii foi descrito pela primeira vez em 1908 em Tunes, na Tunísia, por Nicolle e Manceaux no roedor norte-africano (*Ctenodactylus gundii*) e por Splendore em coelhos, no Brasil (Henriquez *et al.*, 2005; Ferguson, 2009). Devido à observação precoce dos taquizoítos de *T. gondii* dentro dos macrófagos, pensava-se que o parasita poderia estar relacionado com o género *Leishmania*, pois na Tunísia e no Brasil a leishmaniose é endémica (Ferguson, 2009).

O nome *Toxoplasma* tem origem na sua forma de arco (do grego: *toxon* = arco; *plasma* = forma) (Halonen e Weiss, 2013). O termo “*gondii*” advém do primeiro animal aonde foi observado o parasita, *Ctenodactylus gundii* (Nicolle e Manceaux, 1908; Dubey, 2010).

Desde então, descobriu-se que o parasita é capaz de infetar todos os animais de sangue quente, incluindo os humanos, tornando-o um dos parasitas de maior sucesso em todo o mundo. Em 1939, Wolf, Cowen e Paige foram os primeiros a identificar *T. gondii* como agente etiológico de doença congénita humana (Wolf *et al.*, 1939).

Na década de 1950, *T. gondii* foi reportado como uma das principais causas de aborto em ovinos na Nova Zelândia, o que levantou questões sobre potenciais novas vias de transmissão do parasita (Innes, 2010).

A descoberta do gato como hospedeiro definitivo na década de 1960, foi muito importante pois ajudou na descrição do ciclo de vida do parasita, sendo o estágio de oocisto excretado nas fezes de gatos infetados, uma importante fonte de infecção para muitos hospedeiros intermediários, ajudando também a explicar a infecção em animais herbívoros e pessoas com uma dieta vegetariana (Innes, 2010; Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

Os oocistos deste parasita são muito resistentes, podendo sobreviver no ambiente, dependendo das condições climáticas, durante 12 a 18 meses. O conhecimento do ciclo de

vida do parasita, as vias de transmissão, os grupos de risco e as respostas imunitárias do hospedeiro ajudaram no desenvolvimento de estratégias para controlar a doença, reduzir a transmissão do parasita e limitar a contaminação ambiental (Innes, 2010).

2.1.1. Classificação taxonômica

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Reino Protista (Haeckel, 1866), Sub-Reino Protozoa (Goldfuss, 1918 emend. Von Siebold, 1845), Filo Apicomplexa (Levine, 1970), Classe Sporozoea (Leukart, 1879), Sub-classe Coccidia (Leukart, 1879), Ordem Eucoccidia (Léger e Duboscq, 1910), Sub-ordem Eimeriina (Léger, 1911), Família *Sarcocystidae* (Poche, 1913); Sub-Família *Toxoplasmatinae* (Biocca, 1956) e Gênero *Toxoplasma* (Nicolle e Manceaux, 1909).

Até ao momento existe apenas uma espécie, *Toxoplasma gondii*, para o gênero *Toxoplasma* (Dubey, 2010).

2.2. Morfologia do parasita

T. gondii possui três estádios infetantes, o taquizoíto, o bradizoíto e o esporozoíto.

O termo taquizoíto (do grego *takýs* = “rápido”) foi proposto por Frenkel (1973) e refere-se ao estágio de multiplicação rápida do parasita.

O taquizoíto é geralmente de forma crescente ou de arco (Figura 1), com dimensões aproximadas 2 por 6 μm . É composto por vários organelos e corpos de inclusão, incluindo conoide, roptrias, micronemas, mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, entre outros.

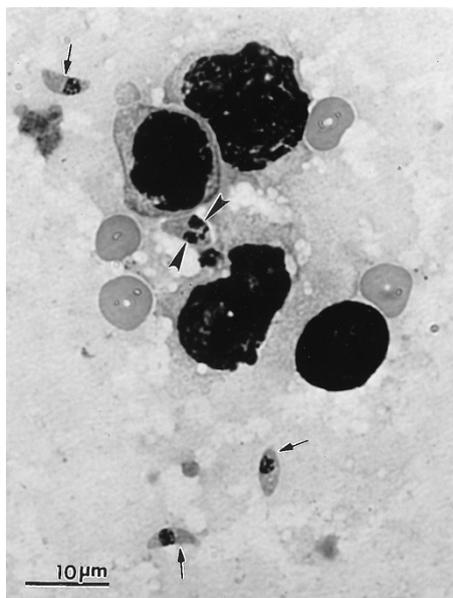


Figura 1. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cabeça de setas). Adaptado de Dubey *et al.* (1998).

O núcleo encontra-se geralmente localizado à área mais central da célula e contém aglomerados de cromatina e um nucléolo central (Dubey *et al.*, 1998).

Embora os taquizoítos se possam mover por deslizamento, flexão, ondulação e rotação, não possuem meios visíveis de locomoção, como cílios, flagelos ou pseudópodes.

As funções da conoide, roptrias e micronemas não são totalmente conhecidas, mas provavelmente estão associadas à penetração ativa ou por fagocitose, do parasita nas células hospedeiras e à criação de um ambiente intracelular adequado para o seu crescimento e desenvolvimento.

Depois de entrar na célula hospedeira, o taquizoíto torna-se ovoide e é cercado por um vacúolo parasitóforo (VP), que parece ser derivado do parasita e da célula hospedeira.

O termo bradizoíto (do grego *bradys* = “lento”) também proposto por Frenkel (1973), refere-se à forma do parasita que se multiplica lentamente dentro de um quisto tecidular (Figura 2).

Os quistos crescem e permanecem intracelulares, à medida que os bradizoítos se dividem por endodogenia.

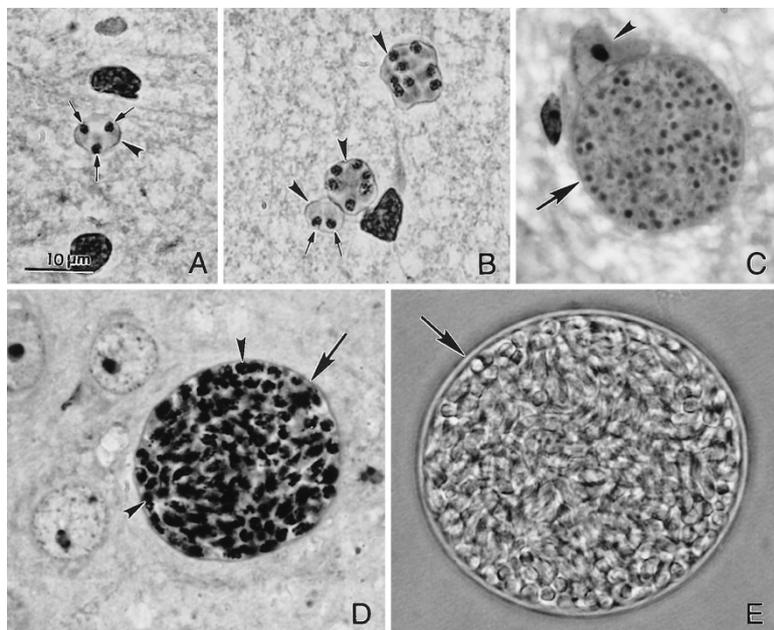


Figura 2. Bradizoítos de *Toxoplasma gondii*. Bradizoítos (setas). Adaptado de Dubey *et al.* (1998).

Os quistos jovens podem ter 5 µm de diâmetro e conterem apenas dois bradizoítos, enquanto os mais velhos podem englobar centenas de organismos. Os quistos no cérebro são geralmente esferoides e raramente atingem um diâmetro de 70 µm, enquanto os quistos

intramusculares são isolados e podem ter 100 µm de comprimento.

Embora os quistos se possam desenvolver em órgãos viscerais, incluindo os pulmões, o fígado e os rins, são mais prevalentes nos tecidos nervoso e muscular, incluindo o cérebro, globo ocular e músculos esquelético e cardíaco.

Os bradizoítos diferem estruturalmente apenas ligeiramente dos taquizoítos sendo que possuem um núcleo situado mais próximo à extremidade posterior (Figura 3); os bradizoítos contêm vários grânulos de amilopectina que coram de vermelho pelo ácido periódico de Schiff (“periodic acid Schiff” – PAS), os grânulos de amilopectina são escassos ou ausentes nos taquizoítos; os bradizoítos são menos suscetíveis à destruição por enzimas gástricas proteolíticas do que os taquizoítos (Dubey *et al.*, 1998).

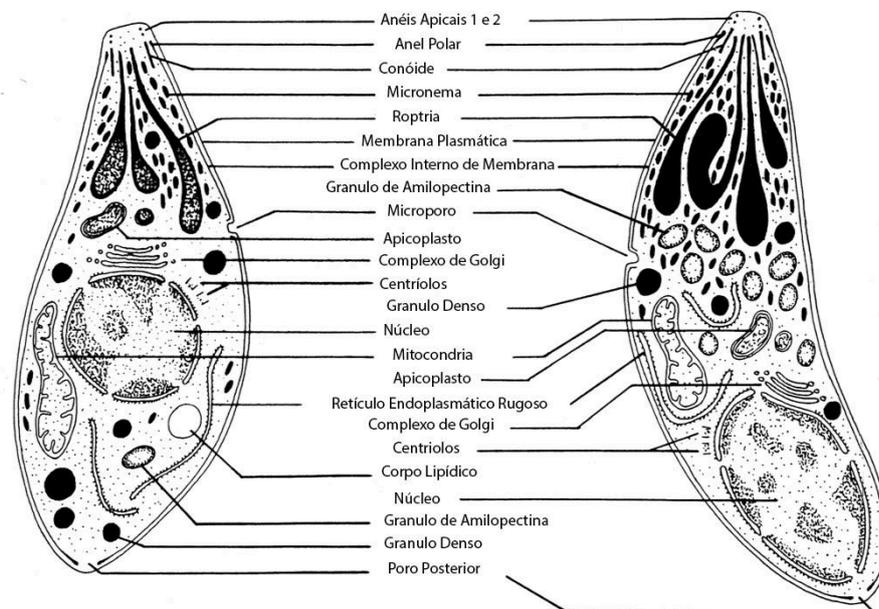


Figura 3. Representação esquemática de taquizoíto (à esquerda) e bradizoíto (à direita) de *T. gondii*. Adaptado de Dubey *et al.* (1998).

O esporozoíto, estágio infetante de *T. gondii* responsável pela contaminação ambiental, encontra-se no interior dos oocistos esporulados. Os oocistos esporulados são sub-esféricos a esféricos e têm um diâmetro de 11 por 13 µm. O oocisto esporulado contém dois esporocistos cada um destes com quatro esporozoítos (Figura 4) (Dubey, 2010).

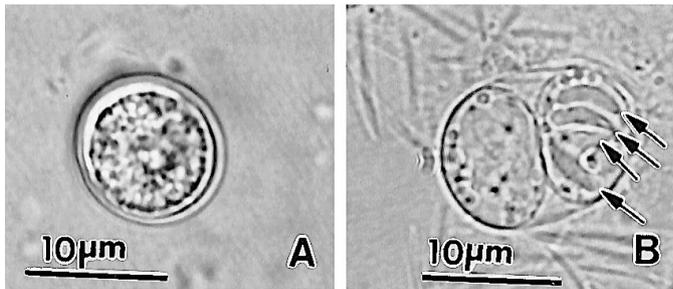


Figura 4. Oocistos de *T. gondii* (A) Oocisto não esporulado. (B) Oocisto esporulado com dois esporocistos. Quatro esporozoítos (setas) são visíveis num único esporocisto. Adaptado de Dubey *et al.* (1998).

2.3. CICLO BIOLÓGICO

2.3.1. Transmissão

Tendo em conta a morfologia do parasita descrita no ponto 2.2. da presente dissertação, as principais vias de transmissão da infeção aos hospedeiros intermediário e definitivo são (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2010):

a) Via horizontal: através da ingestão, por herbívoros, carnívoros e omnívoros, de alimentos (vegetais, frutas, etc), água ou solo contaminados com oocistos esporulados.

b) Via horizontal: através da ingestão por carnívoros e omnívoros de quistos tecidulares na carne ou vísceras de animais infetados.

c) Via vertical: por transmissão placentária de taquizoítos a herbívoros, carnívoros e omnívoros. A via vertical tem importância quando a primoinfeção ocorre durante a gestação, podendo haver infeção da placenta e posteriormente do feto, tanto em seres humanos como em animais (Hill e Dubey, 2002; Jones *et al.*, 2003).

A transmissão horizontal por taquizoítos é considerada geralmente de pouca importância epidemiológica (Dubey, 1998; Tenter *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2001) devido à incapacidade de sobrevivência fora do hospedeiro. No entanto, podem ocorrer infeções por taquizoítos em transplantes de órgãos, produtos sanguíneos e leite não pasteurizado (Tenter *et al.*, 2000; Halonen e Weiss, 2013). Através da ingestão de leite não pasteurizado, ou por via vertical galactófora, pode-se transmitir a infeção por taquizoítos para hospedeiros intermediários (HI) (Dubey, 2010).

O consumo de leite de cabra não pasteurizado foi considerado um fator de risco para a infecção em mulheres grávidas na Europa (Cook *et al.*, 2000) e nos Estados Unidos (Dubey *et al.*, 2014). *T. gondii* pode ser excretado intermitentemente no leite de cabra, e o parasita também pode sobreviver em queijo fresco não pasteurizado (Dubey *et al.*, 2014). No gato a transmissão pelo leite é mais comum que a transmissão por via placentária (Dubey *et al.*, 1995).

O ciclo de vida do *T. gondii* compreende duas fases: a extraintestinal e a enteroepitelial (Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

2.3.2. Fase extraintestinal

A fase extraintestinal pode ter início com a ingestão do oocisto esporulado através de alimentos ou água contaminados (Figura 5), levando posteriormente à libertação de oito esporozoítos no intestino delgado; como também pode suceder através da ingestão de tecidos de animais infetados sendo que, neste caso, a parede do quisto é digerida pelas enzimas proteolíticas do hospedeiro libertando os bradizoítos (Dubey e Frenkel, 1974; Dubey *et al.*, 1998).

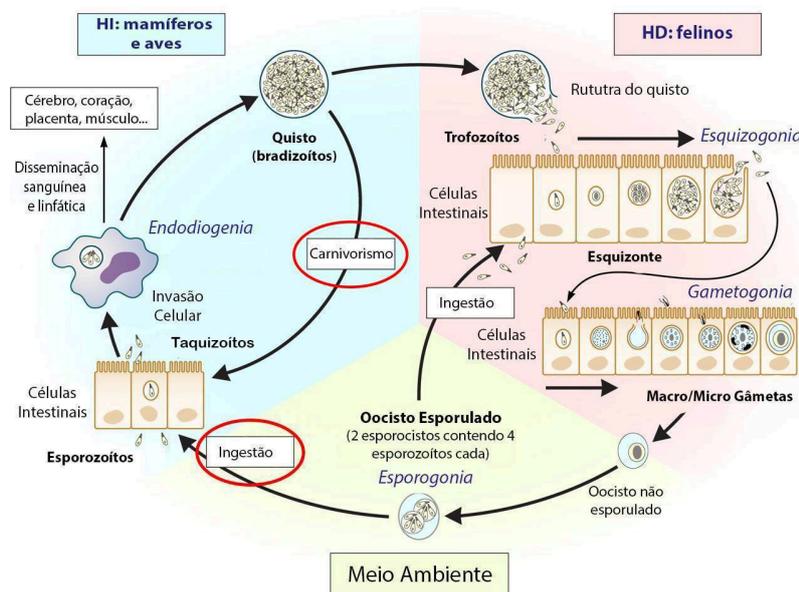


Figura 5. Ciclo de vida do *T. gondii*. Assinalado a vermelho o início do ciclo nos hospedeiros intermédios. Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012).

Tanto os esporozoítos como os bradizoítos vão infetar os enterócitos e os linfonodos circundantes, levando conseqüentemente à sua multiplicação sob a forma morfológica de taquizoíto.

Os taquizoítos multiplicam-se assexuadamente dentro da célula hospedeira por endodiogenia (Figura 6). Na endodiogenia a multiplicação dos taquizoítos é contínua até que

ocorra a rutura e destruição da célula hospedeira, levando à libertação dos organismos parasitários, os quais repetem este ciclo em outras células antes de se disseminarem pelo organismo e serem enquistados (Dubey *et al.*, 1970; Bhopale, 2003).

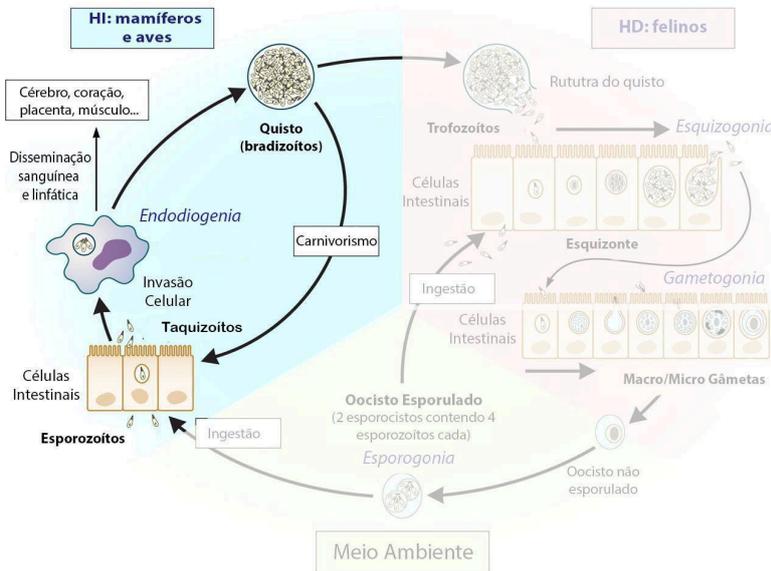


Figura 6. Ciclo de vida do *T. gondii*: endodiogenia. Adaptado de Robert-Gagneux e Dardé (2012).

A disseminação dos taquizoítos, por via linfática e sanguínea, ocorre fundamentalmente para o sistema nervoso central, músculos esquelético e cardíaco, vísceras como fígado e baço, bem como para os linfonodos e globo ocular (Dubey e Beattie, 1988; Zenner *et al.*, 1998).

Este processo é contínuo até que ocorra a morte do hospedeiro ou até que se desenvolva uma resposta imunitária celular protetora contra o parasita, levando à formação de quistos tecidulares e conseqüente abrandamento da endodiogenia (Buxton e Innes, 1995; Bhopale, 2003).

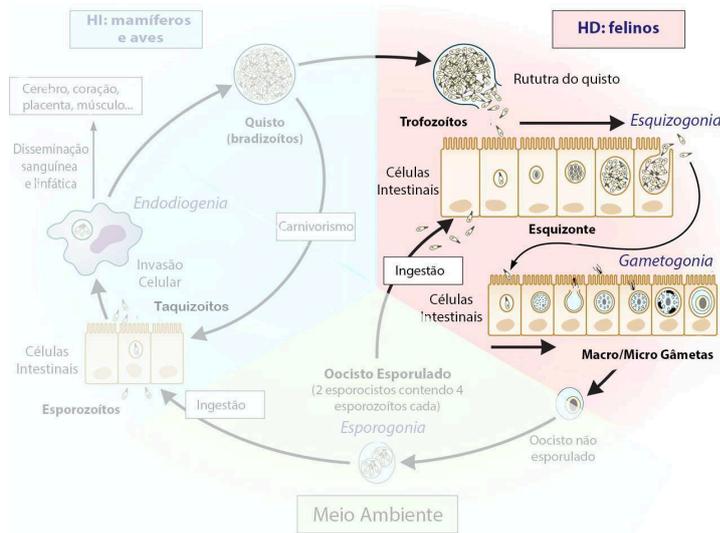
Os bradizoítos, no interior dos quistos tecidulares, predominam durante a infeção crónica e representam a fase latente do parasita, sendo apenas infetantes para outros hospedeiros (Dubey *et al.*, 1970; Tenter *et al.*, 2000).

O ciclo extraintestinal ocorre em todos os hospedeiros. Em hospedeiros definitivos, como o gato, ocorre geralmente em simultâneo com a fase enteroepitelial (Dubey *et al.*, 1970).

2.3.3. Fase enteroepitelial

Esta fase do ciclo tem origem quando felídeos não expostos previamente ao parasita ingerem quistos, pois apenas o estágio de bradizoíto inicia esta etapa nos hospedeiros definitivos (Dubey *et al.*, 1970).

Após a ingestão de bradizoítos, ocorre no intestino dos gatos uma fase assexuada (esquizogonia) e outra sexuada (gametogonia) (Figura 7).



A fase assexuada tem início quando os bradizoítos sofrem um número auto-limitante de multiplicações assexuadas, dando origem a cinco tipos assexuais distintos morfologicamente e designados de esquizontes de tipo A, B, C, D e E.

Figura 7. Ciclo de vida de *T. gondii* no hospedeiro definitivo. Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012).

É através dos merozoítos libertados pelos esquizontes do tipo D e E, encontrados ao longo de todo o intestino delgado (Figura 8), que se dá início à gametogonia. Nesta etapa do ciclo, o núcleo microgamético divide-se formando vários microgâmetas que posteriormente são libertados e mobilizam-se no sentido de penetrar e fertilizar os macrogâmetas maduros (Buxton, 1998).

Após a fertilização é desenvolvida uma camada protetora à volta do zigoto, formando assim o oocisto (Dubey *et al.*, 1998).

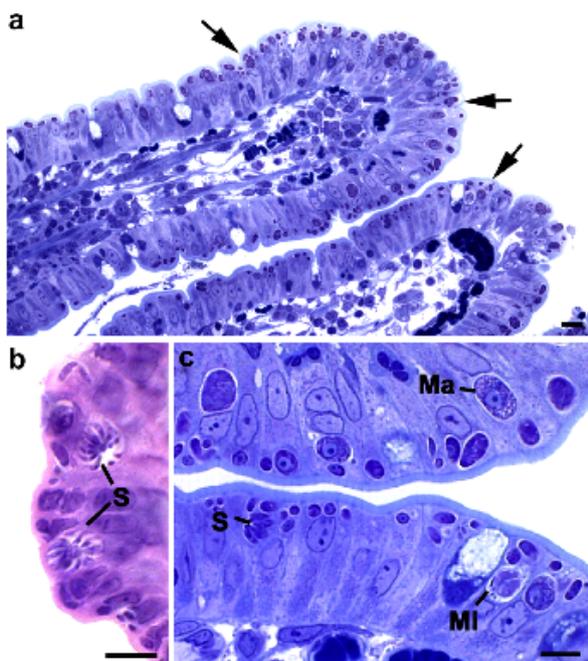


Figura 8. Desenvolvimento coccidiano de *Toxoplasma gondii* no gato. (a-c) Micrografias de luz através do intestino delgado do gato, mostrando vários estádios nos enterócitos (setas). Adaptado de Ferguson (2009).

2.3.4. Eliminação e esporulação de oocistos

Os oocistos formados na fase enteroepitelial são excretados nas fezes apresentando-se na forma não esporulada, ou seja, não são infectantes para os hospedeiros (Dubey *et al.*, 1970; Dumètre e Dardé, 2003).

O processo de esporulação ocorre no meio ambiente dentro de 2 a 3 dias, dependendo das condições de temperatura, humidade e arejamento (Dubey *et al.*, 2011), levando à formação do oocisto esporulado com dois esporocistos, cada um destes contendo quatro esporozoítos (Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

O período pré-patente e a frequência de excreção dos oocistos variam de acordo com o estágio de *T. gondii* ingerido pelo HD.

Assim, e após primoinfeção, os felídeos iniciam a excreção de oocistos 3 a 10 dias após a ingestão de bradizoítos durante um reduzido período de tempo, 1 a 2 semanas, por vezes durante 3 semanas, sem qualquer manifestação clínica (Dubey, 1998; Dumètre e Dardé, 2003).

Após a ingestão de taquizoítos, a eliminação dos oocistos ocorre por volta do 13º dia; e na ingestão de oocistos obtém-se o período pré-patente mais longo superior a 18 dias (Dubey, 1998).

A excreção de oocistos ocorre em 97% de gatos seronegativos após a ingestão de bradizoítos, em 20% após ingestão de taquizoítos e em 16% após a ingestão de oocistos, o que demonstra a importância que, o carnivorismo assumiu na transmissão deste protozoário (Dubey e Frenkel, 1976; Freyre *et al.*, 1989).

O curto período de excreção de oocistos é equilibrado pela produção e disseminação de uma elevada quantidade de oocistos, fazendo assim com que um único gato possa excretar milhares de oocistos num só dia, os quais são muito resistentes às condições ambientais (Dubey, 1998; Dumètre e Dardé, 2003).

2.4. Variabilidade genética

Os primeiros estudos de genotipificação sobre estirpes de *T. gondii*, realizados em um número limitado de estirpes laboratoriais e isolados principalmente de França e dos EUA, levaram à descrição de uma estrutura populacional clonal com três linhagens principais, designadas como tipos I, II e III, estando estas relacionadas fenotipicamente com a virulência

no murganho (Dardé *et al.*, 1988; Sibley e Boothroyd, 1992; Howe e Sibley, 1995). A linhagem do tipo I está associada a doença aguda e compreende estirpes altamente virulentas para murganhos; a do tipo II é responsável pela formação de grande quantidade de quistos em murganhos e associada a doença crónica; e a do tipo III apresentando alguma virulência, embora menos do que a linhagem do tipo I (Howe e Sibley, 1995; Weiss e Kim, 2000).

Estudos genéticos sugerem que o tipo I está associado à toxoplasmose congénita humana, e com menos frequência à infeção animal ou à reativação de infeções crónicas em doentes com SIDA (Howe e Sibley, 1995; Honoré *et al.*, 2000).

No entanto, estudos posteriores encontraram genótipos não pertencentes às três linhagens principais em outros continentes, onde a estrutura populacional de *T. gondii* era mais complexa, com níveis mais altos de variação e recombinação entre algumas populações de parasitas (Su *et al.*, 2003; Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2004).

Esses genótipos foram designados, dependendo dos autores, como genótipos atípicos, exóticos ou recombinantes. A descrição desses genótipos atípicos oferece novas perspectivas na análise de determinantes da virulência (Pena *et al.*, 2007; Dardé, 2008).

Na Europa e na América do Norte os três tipos principais representam uma grande maioria de isolados, onde a criação intensiva de animais de produção e a domesticação de gatos ofereceu um nicho importante às três linhagens principais e conduziu a um empobrecimento da diversidade genética (Lehmann *et al.*, 2003; Ajzenberg *et al.*, 2004).

Entre estas três linhagens, o tipo II é predominante em estudos publicados. Em França é encontrado em mais de 90% dos casos de toxoplasmose congénita humana, sendo a maioria das estirpes isoladas de pacientes com SIDA e numa grande variedade de animais também do tipo II (Montoya e Liesenfeld, 2004; Ajzenberg *et al.* 2009; Xiao e Yolken, 2015).

Estudos no norte de Portugal indicam um predomínio de genótipos do tipo II em ovinos, caprinos e suínos (Lopes *et al.*, 2015). Apesar disto, dados recentes demonstram que, mesmo na Europa, pode haver linhagens recombinantes ou atípicas (Liu *et al.*, 2015).

A troca genética parece ser mais comum em isolados de *T. gondii* no ciclo de vida selvagem ou em áreas onde a domesticação é mais recente. Na América do Sul, as estirpes são altamente divergentes daquelas da Europa ou da América do Norte. A alta diversidade genética observada neste continente é máxima na área amazónica, com polimorfismos únicos (Ajzenberg *et al.*, 2004). Embora os isolados do tipo II tenham sido encontrados no Chile (Dubey *et al.*, 2006), parece muito raro em outros lugares da América do Sul.

3. PATOGENIA E RESPOSTAS IMUNITÁRIAS

Toxoplasma gondii é capaz de invadir e se multiplicar numa grande variedade de células hospedeiras especialmente no sistema nervoso central (SNC) e na placenta (Filisetti e Candolfi, 2004). Apenas a invasão intracelular permite a sobrevivência e o desenvolvimento do parasita, sendo caracterizada por uma entrada rápida do protozoário no vacúolo citoplasmático. Esta capacidade do parasita associada à imunidade do hospedeiro, permite que possam ocorrer duas situações:

- 1) Obtenção de imunidade protetora, contra uma possível reinfeção, em hospedeiros imunocompetentes.
- 2) Desenvolvimento de doença, devido a um defeito na imunidade sistêmica ou local do hospedeiro, em indivíduos imunodeprimidos (Davidson, 2000).

A invasão é caracterizada numa “espécie de fagocitose” pois, há efetivamente uma entrada por invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira, que requer parasitas viáveis e uma secreção coordenada por parte dos organelos secretores especializados. Assim, ocorre primeiro a exocitose do conteúdo dos micronemas, importante na interação precoce com a célula, seguida da exocitose do conteúdo das roptrias, que contribui para o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo (Dubremetz, 1999; MacLaren *et al.*, 2004).

Após esta fase, ocorre a exocitose dos grânulos densos dentro do vacúolo parasitóforo, contribuindo para o aumento da interação metabólica entre o parasita e o hospedeiro (Dubremetz, 1999; MacLaren *et al.*, 2004).

Dentro do vacúolo, o parasita multiplica-se de forma segura escapando a resposta imunitária do hospedeiro (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Os taquizoítos usam a actina e a miosina para penetrar ativamente na célula alvo (MacLaren *et al.*, 2004). Assim, os taquizoítos disseminam-se rapidamente por via sanguínea e linfática, levando à destruição tecidual, a áreas focais de necrose e conseqüentemente a manifestações clínicas da doença (Frenkel, 1990; Montoya e Liesenfeld, 2004; Dubey, 2010).

A virulência das estirpes e o tamanho do inóculo envolvidos na infeção, assim como, os antecedentes genéticos, o género e o estado imunológico do hospedeiro aparentam afetar o curso da infeção. Assim no caso de imunodepressão, os bradizoítos são convertidos novamente em taquizoítos, cuja multiplicação não é controlada pela resposta imunitária do hospedeiro, o que pode conduzir à doença (Subauste e Remington, 1993; Dubey, 2004;

Montoya e Liesenfeld, 2004). Casos destes surgem associados a toxoplasmose em hospedeiros neonatos ou muito jovens cujo sistema imunitário ainda se encontra pouco desenvolvido (Davidson, 2000).

Durante a gestação a alteração da imunidade celular de modo a evitar a rejeição do feto, aumenta a suscetibilidade ao parasita (Smith, 1999; Kendall *et al.*, 2003). A imunidade que se estabelece após uma infeção primária irá, geralmente, proteger o hospedeiro de modo a prevenir a infeção fetal em gestações seguintes (Frenkel, 1990).

3.1. Imunidade celular

Como a multiplicação de *T. gondii* ocorre dentro das células do hospedeiro, os mecanismos imunitários mediados por células são fundamentais para a imunidade protetora durante a infeção (Khan *et al.*, 1994; Bhopale, 2003). Desta forma, é fundamental que as células sanguíneas da linha branca, nomeadamente macrófagos, linfócitos T e as células exterminadoras naturais (NK), em união com as citoquinas trabalhem no desenvolvimento da resposta imunitária.

Devido à preferência do parasita pelo SNC e pela placenta, após a primoinfeção os taquizoítos estimulam os macrófagos, neutrófilos e as células dendríticas a produzir interleucina (IL) 12. A IL-12 possibilita a ativação das NK e dos linfócitos T permitindo a produção de interferão gama (IFN- γ), citocina principal que controla os estádios agudo e crónico da infeção (Suzuki *et al.*, 1988; 2002). As células T CD4 + agem sinergicamente com células T CD8 + para produzir e manter a imunoproteção (Denkers e Gazzinelli, 1993; Kasper e Buzoni-Gatel, 1998).

Sugeriu-se que o efeito citotóxico celular CD8 + que é dirigido contra *T. gondii* aparece durante a fase aguda da infeção, enquanto a atividade das células T CD4 + se intensifica com a cronicidade (Herion e Saavedra, 1993).

As células CD8, depois de serem estimuladas por antígenos de *T. gondii* e na presença de IL-12, como medidor, segregam IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-2, que levam a destruição dos taquizoítos pelos macrófagos (Gazzinelli *et al.*, 1991).

A combinação de IFN- γ e TNF- α , resulta num aumento da produção de radicais livres e de óxido nítrico, que também afeta a destruição de parasita (Sibley *et al.*, 1991; Sher *et al.*, 1993).

3.2. Imunidade humoral

A imunidade humoral é dirigida principalmente ao estágio de taquizoíto. Os anticorpos específicos inibem a ligação do parasita aos recetores das células hospedeiras e, conseqüentemente, dificultam a infecção. A produção de células locais B pode induzir a formação de quisto no tecido (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

Os hospedeiros infetados cronicamente são geralmente resistentes à reinfeção por *T. gondii*, possivelmente devido às imunoglobulinas circulantes. Esta situação é chamada de imunidade concomitante ou premunição (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

A imunoglobulina (Ig) G é considerada a principal classe de imunoglobulina envolvida na resposta humoral contra a infecção por *T. gondii*. Em gatos infetados experimentalmente com *T. gondii*, a IgG foi detetada no soro a partir do dia 13 (Hegab e Al-Mutawa, 2003). Níveis estáveis de IgG indicam um diagnóstico de toxoplasmose crónica (Villard *et al.* 2016). Um aumento significativo nos níveis de IgG, dependendo das técnicas utilizadas, poderá implicar uma reinfeção ou reativação (Villard *et al.* 2016).

Os anticorpos de IgM e IgA são produzidos durante a primeira semana após a infecção (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). No que diz respeito à deteção de IgM é necessária a confirmação com uma segunda técnica, já que técnicas como a ELISA pode detetar IgM por meses ou anos após a infecção. Portanto, a deteção de IgM não é mais um marcador de infecção recente, a menos que seja encontrada em altos títulos. Assim, de forma a confirmar ou excluir uma infecção recente é feita a determinação da avidéz de IgG (Lappalainen M., *et al.* 1993; Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

A IgA é sintetizada por células plasmáticas e desempenha um papel importante na imunidade intestinal, reduzindo a infecção dos enterócitos pelo parasita devido ao facto desta prevenir a aderência do parasita às células epiteliais (Mack e McLeod, 1992; Omata *et al.*, 1997). Nos enterócitos pode ocorrer uma interação entre as imunidades celular e humoral que envolvem as IgA e o IFN- γ (Chardès *et al.*, 1994; Bout *et al.*, 1999).

Pode ser detetada uma resposta humoral nos fluidos corporais, bem como nos tecidos. Os anticorpos podem ser produzidos localmente nos tecidos durante o período de infecção (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* é difícil devido às manifestações clínicas inespecíficas, sendo importante o diagnóstico laboratorial (Hill e Dubey, 2002).

Assim, os métodos de diagnóstico laboratorial incluem (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004):

- a) Diagnóstico direto utilizando tecidos ou fluidos corporais: histopatologia, imuno-histoquímica, PCR e exame coprológico.
- b) Diagnóstico direto, através de isolamento por bioensaio em animais de laboratório e cultivo *in vitro* a partir de fluidos corporais, biopsias ou tecidos *post mortem*.
- c) Diagnóstico indireto: métodos serológicos para a deteção de anticorpos para *T. gondii*.

4.1. Métodos diretos

4.1.1. Citologia e imuno-histoquímica

Após a colheita de fluidos, como líquido cerebrospinal, amniótico ou de lavagem broncoalveolar, bem como de tecidos do hospedeiro provenientes de biópsias ou necrópsias (Remington *et al.*, 2001; Dubey, 2010) é realizado o exame ao microscópio.

Nos fluidos recolhidos, e utilizando a coloração de May-Grünwald Giemsa ou outra derivada de Romanowsky, observa-se, geralmente, o taquizoíto (localizado no interior de vacúolos) (Montoya, 2002; Dubey, 2010).

Já ao nível dos tecidos, observam-se quistos com bradizoítos positivos à coloração pelo PAS (Hill e Dubey, 2002; Dubey, 2010).

Tendo em conta que estas técnicas não são as mais indicadas, por representarem resultados difíceis de interpretar, foi desenvolvida a técnica de imuno-histoquímica que visa identificar as duas formas parasitárias. Assim sendo, é feita a utilização de anticorpos conjugados com fluoresceína ou peroxidase permitindo a diferenciação entre outras coccídeas dos felinos como os géneros *Besnoitia*, *Frenkelia*, *Hammondia*, *Isospora* e *Sarcocystis* (Dubey e Beattie, 1988; Hill e Dubey, 2002).

4.1.2. Exame coprológico

Este exame tem como base a detecção, nas fezes de felinos, de oocistos (Dubey, 2004, 2009). Por ser um método de baixo valor de diagnóstico recorre-se, por vezes, a técnicas de concentração como a flutuação em solução de sacarose (Ruiz e Frenkel, 1980; Dubey e Beattie, 1988) mas, acaba por ser de baixa sensibilidade pois poderá haver um número reduzido de oocistos caso a infeção seja por ingestão de taquizoítos ou oocistos (Dubey, 1996).

A coprologia, neste caso, apenas poderá ser útil num diagnóstico presuntivo (presença de oocistos de 10-12 µm em fezes de gato), sendo confirmada através de bioensaios em murganhos que diferenciam de outras coccídeas morfológicamente semelhantes (Lindquist *et al.*, 2003; Dubey, 2010).

4.1.3. Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction” – PCR) é um teste sensível na detecção do agente. Esta deteta o ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasita em amostras de carne, tecidos ou fluidos corporais, sangue ou urina (Owen *et al.*, 1998; Montoya, 2002). As amostras mais adequadas incluem músculos cardíaco e esquelético, placenta e cordão umbilical (Mason *et al.*, 2010). Esta técnica não distingue formas parasitárias viáveis das não viáveis (Dubey, 2010).

Burg *et al.* (1989) relataram pela primeira vez a detecção de ADN de *T. gondii* de um único taquizoíto, por amplificação do gene B1. Vários testes de PCR subsequentes foram desenvolvidos usando alvos genéticos diferentes. No geral, esta técnica tem-se mostrado muito útil no diagnóstico da toxoplasmose clínica (Weiss e Dubey, 2009).

Note-se que na detecção de ADN, proveniente de oocistos, é possível obter um resultado falso negativo devido à dificuldade na libertação do ADN e à potencial presença de inibidores nas amostras fecais (Schwab *et al.*, 2003; Dabritz *et al.*, 2007; Schares *et al.*, 2008).

A introdução da PCR para a detecção de ADN de *T. gondii* no líquido amniótico permitiu um diagnóstico mais preciso e mais rápido da toxoplasmose congénita (Foulon *et al.*, 1999; Thalib, 2005), evitando o uso de procedimentos mais invasivos no feto. Em situações como o aborto, deve ser feita a recolha e análise por PCR de tecidos fetais, como o fígado, cérebro ou placenta podem fornecer informações importantes (Foulon *et al.*, 1999).

4.1.4. Bioensaio

O bioensaio é uma técnica mais sensível e específica do que o exame citológico ou histológico pois permite o isolamento contornando as dificuldades na observação do parasita.

Tem como base a colheita de fluídos corporais ou tecidos por biopsia ou *post mortem* e pode ser utilizada em amostras digeridas previamente, ou não, pela tripsina ou pepsina (Dubey, 1998b).

No entanto, é um método pouco prático quando se utilizam murganhos, devido à amostra passível de ser testada, sendo mais indicado o bioensaio em gatos, visto que estes podem ingerir maiores quantidades de tecido. Adicionalmente a sensibilidade deste método depende do estágio e do número de parasitas nos tecidos, uma vez que o número de formas parasitárias pode ser demasiado pequeno para ser detetado (Hill e Dubey, 2002).

4.2. Métodos indiretos

O diagnóstico serológico é o mais apropriado para a realização de estudos epidemiológicos, uma vez que a infeção é frequentemente inaparente no hospedeiro imunocompetente (Bastien, 2002; Weiss e Kim, 2011).

O teste de avidéz da IgG demonstrou ser um importante método na distinção entre uma infeção recente e uma infeção crónica em hospedeiros positivos para IgG e IgM (Cozon *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 2002).

4.2.1. Teste de lise

Após bioensaios e exames microscópicos surge o teste de lise (“dye-test” – DT) ou teste do corante Sabin-Feldman, que permitiu um diagnóstico da infeção *ante mortem* através da avaliação de soro (Sabin e Feldman, 1948).

Este teste, deteta as IgM e as IgG e baseia-se na lise dos parasitas pela fixação do complemento na reação entre o antígeno (Ag) e o anticorpo (Ac) com recurso a taquizoítos vivos. Os taquizoítos, não afetados pelo Ac, são uniformemente corados na presença de azul-de-metileno e os que sofrem autólise mediada pelo complemento não coram (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2010).

Apesar de caro e potencialmente perigoso (Reiter-Owona *et al.*, 1999), este é um teste com elevada especificidade e sensibilidade, especialmente no diagnóstico em humanos,

contudo o mesmo não se aplica aos resultados obtidos em algumas espécies animais incluindo ruminantes e algumas espécies de aves (Dubey, 2008; 2010).

4.2.2. Teste da imunofluorescência indireta

O teste da imunofluorescência indireta (“indirect fluorescent antibody test” – IFAT) é um método de elevada especificidade e sensibilidade (Weiss e Kim, 2011), mas tem como desvantagens a necessidade de equipamento especializado, como um microscópio de epifluorescência e de conjugados espécie-específicos e a existência de reações cruzadas (Dubey, 2010).

4.2.3. Ensaio imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático (“enzyme linked immunosorbent assay” – ELISA) pode ser utilizado na deteção de IgG e IgM específicas (Dubey *et al.*, 1995).

É muito usado em estudos sero-epidemiológicos, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Permite a análise de um número elevado de amostras, mas tem como desvantagens o preço e uma maior complexidade em comparação com o teste de aglutinação modificado (“modified agglutination test” – MAT) (Garcia *et al.*, 2006).

4.2.4. Teste de aglutinação modificado

O teste de aglutinação direta desenvolvido por Fulton (1965), baseia-se na pesquisa de IgG através da utilização de taquizoítos inativados por formalina, que aglutinam na presença de anticorpos específicos, apresentando pouca sensibilidade e especificidade (Dubey, 2010). Em 1980, Desmonts e Remington aprimoraram o teste de aglutinação direta (“direct agglutination test” – DAT) pela incorporação de 2-beta-mercaptoetanol (2-ME). Este composto inativa as IgM, permitindo desta forma apenas confirmar a presença de IgG específicas em caso de reação positiva (Desmonts e Remington, 1980). Posteriormente Dubey e Desmonts (1987), adicionaram 2-ME como ultima etapa desta técnica, com o propósito de minimizar a exposição do operador aos vapores do 2-ME, transformando-se assim na técnica conhecida por MAT.

O MAT é um teste sensível e específico para o diagnóstico da infeção crónica por *T. gondii*, tanto em humanos como em animais (Dubey *et al.*, 1995) e é considerado o mais

sensível dos métodos de aglutinação (Dubey e Thulliez, 1989). Este método, não apresenta reações cruzadas (Dubey, 1997), não requer conjugados espécie-específicos nem equipamento especial (Weiss e Kim, 2011).

A demonstração de um aumento no título de IgG, pelo MAT, de quatro vezes em amostras emparelhadas recolhidas em duas a quatro semanas de intervalo, pode ajudar ao diagnóstico da infeção aguda (Lappin, 1996; Davidson, 2000).

4.2.5. Outros testes de aglutinação

Segundo Silva (2007), testes baseados na aglutinação entre antigénio e anticorpo, que não necessitam de conjugado, são de baixo custo e fáceis de executar.

- a) O teste de aglutinação em látex (“latex agglutination test”– LAT) tem como fundamento a associação entre o Ag e uma partícula de látex que em contacto com o anticorpo (IgG) aglutina. No entanto tem uma baixa especificidade e sensibilidade em comparação com os outros testes de aglutinação (Sroka *et al.*, 2008).
- b) O teste de hemaglutinação indireta (“indirect hemagglutination test”– IHAT), onde os eritrócitos revestidos com Ag solúvel de taquizoítos aglutinam na presença de soro positivo, permite detetar as IgG. Embora de fácil concretização e de elevada sensibilidade, as variações técnicas deste teste tornam-no pouco exequível (Dubey, 2010).

5. INFEÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM ANIMAIS

5.1. Infeção por *Toxoplasma gondii* no hospedeiro definitivo

Ao longo dos tempos tem-se vindo a verificar uma crescente urbanização com a diminuição dos habitats naturais das espécies selvagens, fazendo com que ocorra uma maior aproximação entre os animais domésticos e os selvagens. Este contacto, leva à disseminação de doenças como a toxoplasmose e à determinação de novos hospedeiros, tendo sempre em grande plano os felídeos selvagens ou domésticos como hospedeiros definitivos (Davidson, 2000; Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

5.1.1. Distribuição e prevalência

A seroprevalência de infeção no hospedeiro definitivo varia consoante o modo de vida, idade, localização geográfica e com o teste laboratorial utilizado (Gauss *et al.*, 2003).

Gatos vadios ou de meio rural apresentam maior probabilidade de estarem infetados relativamente a felídeos domésticos o que pode estar associado ao contacto com lixo e pequenos mamíferos (Nogami *et al.*, 1998; Tenter *et al.*, 2000).

A alimentação dos animais também possui um peso importante na infeção. Animais alimentados com vísceras e carnes cruas têm maior probabilidade de se infetarem com *T. gondii* quando comparados aos alimentados com rações comerciais (Dubey, 2010; Lopes *et al.*, 2008).

De acordo com vários estudos, gatos seropositivos representam um risco menor que gatos seronegativos uma vez que provavelmente já eliminaram oocistos (Dubey e Thulliez, 1989; Hill *et al.*, 2000; Gauss *et al.*, 2003).

Em Portugal encontram-se publicados em revistas indexadas quatro estudos de seroprevalência em gatos. O estudo realizado em Trás-os-Montes e Alto Douro refere uma seroprevalência de 35,8%, que foi associada ao acesso ao exterior, uma alimentação sem dieta comercial e à idade dos gatos, em que animais mais velhos tinham maior seroprevalência (Lopes *et al.*, 2008). O convívio com outros gatos não foi identificado como um fator de risco para a aquisição da infeção nos gatos em estudo (Lopes *et al.*, 2008). Em Lisboa, a seroprevalência foi de 20,5% em animais domésticos e foi detetado ADN de *T. gondii* nas fezes de 35,6% dos gatos seropositivos (Esteves *et al.*, 2014). Na mesma cidade a seroprevalência em gatos vadios foi de 24,2% (Duarte *et al.*, 2010) e 44,2% (Waap *et al.*, 2012).

A Tabela 1 apresenta alguns valores de seroprevalência de infeção por *T. gondii* em gatos. A seroprevalência na Europa variou entre 18,2% na Holanda (Opsteegh *et al.*, 2012) e 60,8%, na Estónia (Must *et al.*, 2015).

Em países não europeus encontram-se valores que variam de 4,8% a 97,4% (Jittapalapong *et al.*, 2010; Al-Kappany *et al.*, 2010).

Tabela 1. Seroprevalência mundial de infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos

País	Teste (cut-off)	Prevalência (%)	Referência
Angola	MAT (100)	3,9	Lopes <i>et al.</i> , 2017
Argélia*	MAT (6)	50,0	Yekkour <i>et al.</i> , 2017
Egipto*	MAT (5)	95,5	Al-Kappany <i>et al.</i> , 2011
Espanha (Sul)	MAT (25)	50,2	Millán <i>et al.</i> , 2009
Estónia***	MAT (40)	60,8	Must <i>et al.</i> , 2015
Finlândia***	DAT (40)	48,4	Jokelainen <i>et al.</i> , 2012
França*	MAT (20)	18,6	Afonso <i>et al.</i> , 2006
Holanda	ELISA (NE)	18,2	Opsteegh <i>et al.</i> , 2012
Letónia***	ELISA (NE)	51,6	Deksne <i>et al.</i> , 2013
Noruega	DAT (40)	41,0	Sævik <i>et al.</i> , 2015
Portugal (norte)	MAT (20)	35,8	Lopes <i>et al.</i> , 2008

DAT– teste de aglutinação direta; ELISA – ensaio imunoenzimático; OD – "optical density"(densidade ótica); MAT – teste de aglutinação modificado; *gatos vadios, **gatos em ambiente doméstico, ***gatos vadios e domésticos; NE – não especificado.

5.1.2. Quadro clínico e lesional

A grande maioria dos gatos infetados por *T. gondii* não apresentam sinais clínicos (Dubey, 2010).

A gastrite fibrosante eosinofílica foi descrita recentemente em um gato infetado por *T. gondii* (McConnell *et al.*, 2007).

A toxoplasmose fatal pode desenvolver-se, após infecção primária, devido à multiplicação intracelular de taquizoítos tecidos hepáticos, pulmonares, SNC e pâncreas (Dubey e Lappin, 2006; Lappin, 2010).

Os gatinhos infetados por via transplacentária ou transmamária desenvolvem sinais clínicos mais graves de toxoplasmose e geralmente morrem de doença pulmonar ou hepática (Côté, 2011; Davidson, 2000).

As manifestações clínicas em gatos com toxoplasmose sistêmica incluem depressão, anorexia, febre, seguida de hipotermia, derrame peritoneal, icterícia e dispneia. Esta

apresentação da doença encontra-se documentada em gatos concomitantemente infetados com vírus da leucemia felina, imunodeficiência felina ou vírus de peritonite infecciosa felina, bem como após administração de ciclosporina (Beatty e Barrs, 2003; Nordquist e Aronson, 2008).

A toxoplasmose parece ser uma causa comum de uveíte em gatos com uveíte anterior ou posterior e as lesões podem ser unilaterais ou bilaterais (Dubey e Lappin, 2006; Powell, 2010). Ao contrário do homem, as lesões oculares ocorrem primeiro na coroide com inflamação secundária da retina, devendo ser descrita como coriorretinite e não retinocoroidite (Davidson e English, 1998; Davidson, 2000). A toxoplasmose ocular está muitas vezes associada a infeção sistémica (Davidson, 2000).

A pneumonia é a manifestação clínica mais importante da toxoplasmose felina adulta. Outros sinais clínicos incluem hepatite, necrose pancreática, miosite, miocardite, uveíte, dermatite, encefalite e coriorretinite (Davidson, 2000; Dubey e Jones, 2008).

A toxoplasmose crónica ocorre em alguns gatos e deve constar na lista de diagnósticos diferenciais para gatos com uveíte anterior ou posterior, lesões cutâneas, febre, hiperestesia muscular, miocardite com arritmias, perda de peso, anorexia, convulsões, ataxia, icterícia, diarreia, dispneia ou pancreatite (Simpson *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007).

5.2. Infeção por *Toxoplasma gondii* em bovinos

Estudos indicam que o consumo de carne crua ou malpassada de bovino pode contribuir para a infeção por *Toxoplasma gondii* em humanos (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2010). No entanto, raramente são encontrados quistos nos músculos dos bovinos, uma vez que não são considerados hospedeiros adequados para *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000).

Embora suscetíveis à infeção, os bovinos são considerados bastantes resistentes ao desenvolvimento de doença, porque acabam por, num período de tempo curto, eliminar ou reduzir a carga parasitária a níveis indetetáveis. Este facto deve-se provavelmente à resistência inata e reação específica dos bovinos em relação a *T. gondii* e à capacidade de resposta imune dos animais para remover o agente (Hamidinejat *et al.*, 2010).

5.2.1. Distribuição e prevalência

A seroprevalência de infeção por *T. gondii* em bovinos, a nível mundial é bastante variável, sendo escassos estudos recentes (Tabela 2), possivelmente porque os bovinos são considerados uma espécie resistente ao parasita (Dubey, 2010).

No norte de Portugal a seroprevalência foi de 7,5% valor esse semelhante ao norte de Espanha (Galiza) de 7,3% (Panadero *et al.*, 2010).

Estudos em países como o Brasil e a Sérvia sugerem que uma elevada proporção do gado amostrado foi exposta ao parasita (Klun *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009).

A seroprevalência da infeção por *T. gondii* no continente africano, variou de 3,6% e 32% (Tonouhewa *et al.*, 2017).

Tabela 2. Seroprevalência mundial de infeção por *Toxoplasma gondii* em bovinos

País	Teste (cut-off)	Prevalência (%)	Referência
Brasil	IFAT (64)	71,0	Santos <i>et al.</i> , 2009
China	IAT*	2,3	Yu <i>et al.</i> , 2007
Espanha (norte)	DAT (40)	7,3	Panadero <i>et al.</i> , 2010
França	MAT (24)	7,8	Gilot-Fromont <i>et al.</i> , 2009
Nigéria	ELISA (NE)	13,9	Onyiche e Ademola, 2015
Portugal (norte)	MAT (100)	7,5	Lopes <i>et al.</i> , 2013
Senegal	MAT (6)	13,0	Davoust <i>et al.</i> , 2015
Sérvia	MAT (25)	76,3	Klun <i>et al.</i> , 2006
Sudão	ELISA (NE)	13,3	Elfahal <i>et al.</i> , 2013
Turquia	ELISA (OD: 0.5)	4,0	Zhou <i>et al.</i> , 2017

DAT – teste de aglutinação direta; ELISA – ensaio imunoenzimático; IAT – teste de aglutinação indireta (“indirect agglutination test”); IFAT – teste de imunofluorescência indireta; IHAT – teste de hemaglutinação indireta; LAT – teste de aglutinação em látex; OD – densidade ótica; MAT – teste de aglutinação modificado; NE – não especificado.

*teste comercial de aglutinação indireta (IAT, Lanzhou Veterinary Institute of China Academy of Agriculture and Science) de acordo com o manual de instruções.

5.2.2. Quadro clínico e lesional

A infeção natural em bovinos foi diagnosticada pela primeira vez na Alemanha por Houersdorf e Holtz (1952) e citada por Scarpelli *et al.* (2009).

Os sinais clínicos que se podem observar incluem a pirexia, hiporexia e diarreia experimentalmente em adultos, (Scarpelli *et al.*, 2009) e o aborto (Shaapan, 2016). No

entanto, o aborto é raro, sendo mais prevalente em infecções por *Neospora caninum* (Dubey, 2010; Elfahal *et al.*, 2013).

5.3. Infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos

5.3.1. Distribuição e prevalência

Os ovinos são considerados muito suscetíveis à infecção por *T. gondii* (Guo *et al.*, 2015). A prevalência de infecção pode variar de acordo com a idade do animal, localização geográfica, densidade populacional, área de pastoreio e prática agrícola (Guo *et al.*, 2015). Condições climáticas temperadas prolongam o tempo de sobrevivência dos oocistos (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2013).

Segundo Dubey (2009) a prevalência de infecção aumenta com a idade. Katzer *et al.* (2011) relataram que a seroprevalência em ovinos aumentou de 37,7% em ovelhas de um ano para 73,8% em ovelhas com mais de 6 anos.

Os animais criados com acesso ao meio ambiente encontram-se expostos ao solo e à água, fontes potenciais de infecção por *T. gondii* (Guo *et al.*, 2015).

Em Portugal existem dois estudos de seroprevalência envolvendo pequenos ruminantes, ambos realizados no norte do país. O primeiro registou 17,1% de seroprevalência em ovinos (Sousa *et al.*, 2009) e o segundo apontou uma seroprevalência de 33,6% (Lopes *et al.*, 2013). Este valor é próximo do obtido no norte de Espanha, de 38,1%, por Díaz *et al.* (2014).

A seroprevalência de infecção por *T. gondii* mundial em ovinos encontra-se resumida na Tabela 3, sendo indicados alguns dos estudos mais recentes.

Tabela 3. Seroprevalência mundial de infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos

País	Teste (cut-off)	Prevalência (%)	Referência
Argentina	IFAT (50)	10,0	Hecker <i>et al.</i> , 2018
China	MAT (25)	20,7	Yang <i>et al.</i> , 2017
Chipre	ELISA (NE)	44,9	Liassides <i>et al.</i> , 2016
Egipto	IFA (100); ELISA (NE)	16,3	Al-Kappany <i>et al.</i> , 2018
Espanha (norte)	ELISA; MAT (NE)	38,1	Díaz <i>et al.</i> 2014
Grécia	ELISA (NE)	53,7	Anastasia <i>et al.</i> , 2013
Itália	IFAT (64)	59,3	Gazzonis <i>et al.</i> , 2015
México	ELISA (NE)	24,4	Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2017
Nigéria	ELISA (NE)	6,7	Kamani <i>et al.</i> , 2010
Polónia	ELISA (NE)	55,9	Holec-Gasior <i>et al.</i> , 2015
Portugal	MAT (20)	17,1	Sousa <i>et al.</i> , 2009
	MAT (20)	33,6	Lopes <i>et al.</i> , 2013
Senegal	MAT (6)	16,0	Davoust <i>et al.</i> , 2015
Sérvia	MAT(25)	84,5	Klun <i>et al.</i> , 2006
Turquia	ELISA (OD: 0.5)	20,0	Zhou <i>et al.</i> , 2017

ELISA – ensaio imunoenzimático; IFAT – teste de imunofluorescência indireta; OD – densidade ótica; MAT – teste de aglutinação modificado. NE – não especificado.

Estudos envolvendo países do continente africano, remetem para uma seroprevalência mais baixa em relação aos restantes países incluídos na Tabela 3. Estas diferenças poderão estar relacionadas com vários fatores incluindo a área de estudo e o método de diagnóstico utilizado (Klun *et al.*, 2006).

Os ovinos e caprinos mantidos em sistemas extensivos, ou em contacto com outros animais, incluindo gatos, apresentam geralmente valores mais elevados de seroprevalência (Almería *et al.*, 2018).

Os caprinos beneficiam, geralmente, um manejo semelhante ao dos ovinos. A má gestão nas explorações, ou explorações com várias espécies foram relacionadas positivamente com a infecção por *T. gondii* (Klun *et al.*, 2006). Cabras em rebanhos com ovelhas apresentaram 1,3% mais probabilidade se serem infetadas (Gazzonis *et al.*, 2015). A transumância de rebanhos e a troca de machos reprodutores também foram considerados fatores de risco (Mendonça *et al.*, 2013; Gazzonis *et al.*, 2015).

No norte de Portugal encontra-se reportado uma seroprevalência de 18,5% em caprinos (Lopes *et al.*, 2013), enquanto no sul de Espanha observou-se que 5,6% dos caprinos eram seropositivos para *T. gondii* (Almería *et al.*, 2018).

A seroprevalência mundial neste hospedeiro está documentada na Tabela 4.

Tabela 4. Seroprevalência mundial de infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos

País	Teste (cut-off)	Prevalência (%)	Referência
Argentina	IFAT (100)	40,8	Gos <i>et al.</i> , 2017
China	ELISA (NE); IFAT (50)	29,5	Liu <i>et al.</i> , 2015
Chipre	ELISA (NE)	35,8	Liassides <i>et al.</i> , 2016
Egipto	IFA (100) e ELISA (NE)	62,0	Al-Kappany <i>et al.</i> , 2018
Espanha (sul)	MAT (25)	5,6	Almería <i>et al.</i> , 2018
Grécia	ELISA (NE)	61,3	Anastasia <i>et al.</i> , 2013
Itália	IFAT (64)	41,7	Gazzonis <i>et al.</i> , 2015
México	MAT (25)	31,0	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2011
Nigéria	ELISA (NE)	4,6	Kamani <i>et al.</i> , 2010
Polónia	DAT (40)	70,0	Sroka <i>et al.</i> 2017
Portugal (norte)	MAT (20)	18,5	Lopes <i>et al.</i> , 2013
Senegal	MAT (6)	15,0	Davoust <i>et al.</i> , 2015
Sérvia	MAT (25)	73,3	Djokic <i>et al.</i> , 2014
Turquia	ELISA (OD: 0.5)	12,9	Zhou <i>et al.</i> , 2017

DAT – teste de aglutinação direta; ELISA – ensaio imunoenzimático; IFAT – teste de imunofluorescência indireta; OD – densidade ótica; MAT – teste de aglutinação modificado; NE – não especificado.

5.3.2. Quadro clínico e lesional

A elevada seropositividade relatadas em ovinos e caprinos indica que estes parecem ser suscetíveis à infecção por *T. gondii* (Iovu *et al.* 2012; Djokic *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015). A infecção pode provocar sinais clínicos nos animais os quais recuperam normalmente 12 a 14 dias após a infecção.

Os sinais clínicos observados incluem dispneia, hiporexia e pirexia que surge 5 dias após a infecção e pode manter-se por 2 a 10 dias (Dubey, 2010; Castaño *et al.*, 2016). Os

caprinos são mais sensíveis do que os ovinos, podendo ocorrer a morte do animal (Dubey, 2010).

Cordeiros infetados oralmente apresentam lesões, principalmente, a nível do cérebro, como focos gliais e perivasculares, e no coração com focos de miosite intersticial (Benavides *et al.*, 2011). Foram observadas estruturas semelhantes a quistos tecidulares e a taquizoítos no cérebro, principalmente no córtex cerebral e no mesencéfalo, mas também no coração, pulmão e gânglios linfáticos (Benavides *et al.*, 2011).

Abortos devido à toxoplasmose são geralmente epizoóticos e dependem da fase da gestação em que a primoinfeção ocorre sendo o tempo médio entre a infeção e o aborto de 4 semanas (Dubey, 2010; Castaño *et al.*, 2016). Caso a infeção ocorra no último mês de gestação, as lesões são em menor número ou os cordeiros podem nascer com alterações ligeiras (Dubey, 2010; Castaño *et al.*, 2016).

No feto podem ser visíveis alterações macroscópicas pouco específicas como anasarca, ou lesões mais específicas no fígado e cérebro, bem como alterações como meningoencefalite não supurativa, miocardite e pneumonia (Dubey, 2010; Castaño *et al.*, 2016).

Dubey (2010) refere que após primoinfeção apenas 1% das ovelhas volta a abortar. No entanto, Morley *et al.* (2008) observaram em animais provenientes da mesma ovelha, sendo que o primeiro congenitamente infetado, o segundo cordeiro apresentava um risco de infeção congénita de 69%. Da mesma forma, se um cordeiro tivesse abortado, haveria um risco de 55% de aborto no próximo cordeiro produzido. Estes dados sugerem que a imunidade ao longo da vida para infeções por *T. gondii* nem sempre pode ser adquirida após uma infeção inicial e levanta a questão sobre se os mecanismos de transmissão de *T. gondii* antes e durante a gestação de ovinos são totalmente compreendidos (Morley *et al.*, 2008).

Nos caprinos, os abortos devidos à toxoplasmose são menos frequentes do que nos ovinos (Dubey, 2010).

As principais lesões surgem na placenta e incluem necrose, pequenos nódulos calcários com 2 mm de diâmetro, manchas ou pontos brancos que podem confluir. Diferentes cotilédones podem estar em diferentes fases de infeção (Dubey, 2010; Castaño *et al.*, 2016).

5.4. Infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos

5.4.1. Distribuição e prevalência

Os valores de seroprevalência variam entre países e são influenciados pelos sistemas agrícolas e pela presença de outros fatores de risco (Belluco *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015).

O sistema de produção é um fator importante no processo de avaliação de risco, tendo em consideração as tendências atuais para o consumo de carne de criação biológica, o que pode provocar o ressurgimento de elevadas percentagens de infecção (van der Giessen *et al.*, 2007; Veronesi *et al.*, 2011). Além disso, um dos fatores mais importantes, que potenciam o contacto com as formas infetantes do parasita nessas explorações de suínos é a presença de gatos (García-Bocanegra *et al.*, 2010; Cenci-Goga *et al.*, 2013).

Outros fatores que contribuem para a infecção em suínos incluem a idade dos animais, o tamanho da exploração, o tipo de instalações e a sua manutenção, a presença de animais silváticos, a ausência de controlo de roedores, a possibilidade de contacto com cadáveres ou uma temperatura favorável para a esporulação dos oocistos (Villari *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2014).

A seroprevalência aumenta com a idade, sendo geralmente mais elevada em suínos mais velhos criados ao ar livre, pois têm maior probabilidade de contactarem com oocistos esporulados ou hospedeiros intermediários infetados (Dubey, 2010; Blagojevic e Antic, 2014; Basso *et al.*, 2015). No entanto, em Portugal, Esteves *et al.* (2004) verificaram uma maior seroprevalência de infecção entre os jovens (6 a 12 meses) quando comparada aos adultos jovens (12 a 24 meses).

Portugal é tradicionalmente um grande consumidor de carne de porco. A seroprevalência de infecção por *T. gondii* em suínos do centro e do sul de Portugal, destinados ao consumo humano, foi de 7,1% (Esteves *et al.*, 2014). Esta seroprevalência é inferior aos 9,8% observados nos porcos do norte de Portugal (Lopes *et al.*, 2013). Essas discrepâncias podem ser explicadas pelas diferenças nos fatores epidemiológicos, como as condições climáticas, o período de recolha de amostras e as práticas de manejo (Esteves *et al.*, 2014).

A seroprevalência mundial neste hospedeiro está documentada na Tabela 5.

Tabela 5. Seroprevalência mundial de infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos

País	Teste (cut-off)	Prevalência (%)	Referência
Burkina Faso	ELISA, PCR (NE)	29,0	Bamba <i>et al.</i> , 2016
Brasil	ELISA (NE)	25,5	Sousa <i>et al.</i> , 2014
Costa do Marfim	ELISA (NE)	8,8	Prangé <i>et al.</i> , 2009
China	IHAT (64)	4,6	Chang <i>et al.</i> , 2013
EUA	ELISA (NE)	2,6	Hill <i>et al.</i> , 2010
Etiópia	DAT (40)	32,1	Gebremedhin <i>et al.</i> , 2015b
Gana	ELISA (O.D.>0.499); IFAT (16)	39,0	Arko-Mensah <i>et al.</i> , 2000
Itália	IFAT (16)	16,1	Veronesi <i>et al.</i> , 2011
México	MAT (25)	12,7	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2011
Nigéria	ELISA (NE)	29,1	Onyiche e Ademola, 2015
Polónia	ELISA (NE)	19,2	Holec-Gasior <i>et al.</i> , 2010
Portugal	MAT (40)	7,1%	Esteves <i>et al.</i> , 2014
	MAT (20)	9,8%	Lopes <i>et al.</i> , 2013
Sérvia	MAT (25)	9,2	Klun <i>et al.</i> , 2011

*Brasil, Suíça, Portugal: quintas. DAT- teste de aglutinação direta; ELISA – ensaio imunoenzimático; IFAT – teste de imunofluorescência indireta; IHAT – teste de hemaglutinação indireta; OD – densidade ótica; MAT – teste de aglutinação modificado; NE – não especificado; PCR – reação em cadeia da polimerase.

5.4.2. Quadro clínico e lesional

Os suínos são muito suscetíveis à infecção por *T. gondii* embora, normalmente, não evidenciem sinais clínicos (Cook *et al.*, 2000). A toxoplasmose clínica grave, é considerada rara nos suínos. Os surtos de toxoplasmose em porcos causam maior mortalidade em jovens do que em adultos (Dubey e Beattie, 1988; Dubey, 2004).

De acordo com Okamoto *et al.* (1989) e Weissenbock e Dubey, (1993), os sinais

clínicos incluem anorexia, febre, dispneia e fraqueza dos membros.

Recentemente, Kim *et al.* (2009) relataram, em porcas gestantes, sinais clínicos como febre, anorexia, sinais neurológicos e aborto. Foram observados focos de necrose com taquizoítos em órgãos como linfonodos, pulmões, fígado e baço (Kim *et al.*, 2009).

5.5. Infecção por *Toxoplasma gondii* em outras espécies animais

5.5.1. Distribuição e prevalência

São vários os fatores que podem influenciar a seroprevalência de infecção por *T. gondii* em cães incluindo a idade do animal, sendo que animais mais velhos têm maior probabilidade de serem expostos ao parasita, o tipo de alojamento, o tipo de alimentação, e a oportunidade de o cão ingerir pequenos mamíferos ou aves. O tipo de alimentação é identificado como o principal fator de risco, uma vez que animais alimentados com comida comercial apresentam menor probabilidade de adquirirem a infecção, do que animais alimentados com comida caseira ou carne e vísceras cruas que não sofram tratamento térmico (Dubey, 2010; Lopes *et al.*, 2011).

Os cavalos são considerados, assim como os bovinos, hospedeiros resistentes. No entanto, tem sido isolado parasitas viáveis de cavalos abatidos para exportação (Al-Khalidi e Dubey, 1979), indicando que o consumo de carne deste animal é uma fonte potencial de infecção humana (Dubey e Jones, 2008). A seroprevalência varia consoante a área geográfica (Kouam *et al.*, 2010; Boughattas *et al.*, 2011; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012), as normas de higiene das explorações na alimentação dos animais, ou o acesso dos gatos à água de bebida para os animais (Boughattas *et al.*, 2011; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012). Animais alimentados com grão e forragens secas ou explorações com feno armazenado estiveram associadas a uma seroprevalência mais elevada, possivelmente pela proximidade de gatos utilizados no controlo de roedores (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012; Valença *et al.*, 2015). No norte de Portugal a seroprevalência em equinos foi de 13,3% (Lopes *et al.*, 2013b), dados mais recentes no continente africano, referem uma seroprevalência de 30,0% no Senegal (Davoust *et al.*, 2015).

As galinhas e outras aves são um bom indicador da contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* uma vez que estes hospedeiros se alimentam diretamente do solo, sendo a seroprevalência de infecção entre 30-50% em galinhas de vida livre (Wang, 2015).

O frango é um dos principais recursos alimentares para os seres humanos e, por isso, pode ser considerado como uma fonte potencial de infecção se a carne de frango for ingerida

mal passada (Wang, 2015). No entanto, esta carne é geralmente consumida bem passada devido, ao risco de infecção por outros agentes como *Salmonella* spp. (Guo *et al.*, 2016).

Os animais silváticos são elementos importantes no ecossistema e a maioria das espécies domésticas convive com estes animais. Desta forma, o conhecimento sobre a seroprevalência da infecção na fauna silvática permite-nos estimar o nível de contaminação ambiental e identificar possíveis fatores de risco. A seroprevalência nas populações silváticas varia ao longo do tempo e com as condições climáticas. Segundo Tidy *et al.* (2017), a seroprevalência de infecção por *T. gondii* foi de 34,5% em animais silvestres em cativeiro em 2 parques zoológicos no norte de Portugal. Neste estudo, mais de metade (52,6%) de todas as espécies silvestres em cativeiro estudadas tinham pelo menos um animal seropositivo, confirmando que este parasita pode infectar uma grande variedade de animais de sangue quente.

Os javalis são animais omnívoros que consomem uma grande variedade de alimentos à base de plantas, bem como animais vivos e mortos. Eles estão entre os grandes mamíferos mais amplamente distribuídos no mundo e a sua população aumentou dramaticamente nas últimas décadas (Massei *et al.*, 2015). Devido à existência de elevadas prevalências de infecção, os javalis podem ser um modelo biológico adequado para analisar a dinâmica de infecção por *T. gondii* no ambiente (Beral *et al.*, 2012). A seroprevalência descrita foi de 32% na América do Norte, 26% na Europa, 13% na Ásia e de 5% na América do Sul (Rostami *et al.*, 2017).

A toxoplasmose causa doença grave, muitas vezes fatal, em marsupiais australianos, macacos do Novo Mundo, gatos Pallas e canários (Dubey e Beattie, 1988; Dubey e Odening, 2001; Dubey, 2002b; Kenny *et al.*, 2002). Segundo Gebremedhin *et al.* (2016) a seroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em camelos da Etiópia é de 8,33%, refletida numa deficiente prevenção, através das medidas de biossegurança, por parte dos pastores.

É importante salientar que, o *T. gondii* não parasita animais poiquilotérmicos, os moluscos bivalves ao filtrarem a água podem concentrar oocistos (Arkush *et al.*, 2003; Lindsay *et al.*, 2004). Em mamíferos marinhos, como a lontra-marinha e o golfinho foram detetadas seroprevalências de 60% e 98% respetivamente. No entanto, a forma de infecção dos mamíferos marinhos ainda não está totalmente esclarecida sendo as mais prováveis a ingestão de oocistos diretamente da água do mar ou a ingestão de moluscos bivalves (Dubey,

2004), uma vez que os oocistos de *T. gondii* são extremamente resistentes às influências ambientais, podendo sobreviver na água do mar durante meses (Lindsay *et al.*, 2002, 2003).

5.5.2. Quadro clínico e lesional

A infecção em cães é geralmente assintomática. A toxoplasmose em cães está associada a patologias concomitantes que levam a perda da imunidade, permitindo a proliferação do parasita, como no caso do vírus da esgana (Campbell *et al.*, 1955).

A infecção congénita é rara, sendo frequentemente fatal (Davidson, 2000). Em animais jovens, com menos de um ano, os sinais clínicos incluem febre, icterícia, dispneia e amigdalite (Côté, 2011). Em exame *post mortem* podem ser encontradas lesões compatíveis com nefrite, pneumonia, miocardite, hepatite, encefalite e afeções das adrenais (Dubey *et al.*, 2003; Dubey, 2010).

Até ao momento não se encontram relatados casos naturais de toxoplasmose clínica em cavalos (Dubey, 2010). Segundo Dubey (1985) animais infetados experimentalmente não manifestaram qualquer alteração clínica.

Em aves selvagens estão descritos casos de toxoplasmose em perus dos EUA com esplenomegalia, hepatite multifocal necrótica e dermatite crostosa no pescoço e cabeça (Quist *et al.*, 1995) e numa codorniz da Califórnia que apresentava apatia, dispneia grave, acabando por morrer.

As galinhas raramente apresentam sinais clínicos quando infetadas por *T. gondii*. Os sinais clínicos reportados de toxoplasmose em galinhas incluem anorexia, apatia, alterações oculares e neurológicas como torcicolos e incapacidade de se manter em pé ou em decúbito lateral (Dubey, 2008, 2010a).

Em Espanha foi diagnosticada toxoplasmose congénita após a necropsia de um javali fêmea sem sinais clínicos, gestante de 3 crias que se encontravam infetados e um apresentava malformações congénitas (Calero-Bernal *et al.*, 2013).

Toxoplasmose congénita foi também descrita em lontras-marinhas (Miller *et al.*, 2008a), sendo *T. gondii* responsável por 16% das mortes destes animais na Califórnia, causando meningoencefalite não supurativa (Miller *et al.*, 2004).

6. INFEÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM SERES HUMANOS

A toxoplasmose possui um elevado impacto socioeconómico em termos de saúde pública, com custos elevados de tratamento, sofrimento pessoal de crianças e adultos doentes, e consequências como deficiência mental, cegueira ou mesmo morte (Roberts *et al.*, 1994).

Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infetada com *T. gondii*.

6.1. Distribuição e prevalência

A seroprevalência, no continente africano, em mulheres gestantes ronda os 80%, sendo 92,5% no Gana (Ayi *et al.*, 2009) e superior a 68% na Etiópia (Bamba *et al.*, 2017).

Os resultados da República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDSTP) e países próximos como a Nigéria, Camarões e, Gabão (Tabela 6) demonstram um contacto precoce com *T. gondii*, provavelmente na infância (Bisvigou *et al.*, 2009).

Tais variações de seroprevalência podem ser devidas a diferenças nas condições climáticas (clima seco, precipitação, temperatura, tipo de solo, altitude) e hábitos socioculturais, incluindo práticas higiénicas e hábitos alimentares, económicos, e a nível educacional (Bamba *et al.*, 2017). Além disso, as diferenças nos métodos serológicos utilizados e a diferença de sensibilidade poderiam também ajudar a explicar essa discrepância.

Tabela 6. Seroprevalência mundial de infecção por *Toxoplasma gondii* em seres humanos

País	Teste (cut-off)	População estudada	Prevalência (%)	Referência
Angola	PCR	Mulheres grávidas	27,3	Lobo <i>et al.</i> , 2016
Brasil	IFAT (40)	Homens e mulheres	97,4	Santos <i>et al.</i> , 2009
Camarões	ELISA (NE)	Mulheres em idade fértil	54,5	Wam <i>et al.</i> , 2016
	ELISA IgG (NE)	Mulheres grávidas	70,0	Njunda <i>et al.</i> , 2011
Etiópia	LAT (NE)	Mulheres grávidas	68,4	Agmas <i>et al.</i> , 2015
Gabão	ELISA	Indivíduos com menos de 15 anos	57,4	Bisvigou <i>et al.</i> , 2009
	ELFA*	Mulheres grávidas	56,0	Mickoto <i>et al.</i> , 2010
Gana	ELISA (NE)	Mulheres grávidas	92,5	Ayi <i>et al.</i> , 2009
Nigéria	Vários	Homens e mulheres	32,0	Ohiolei e Isaac, 2016
Portugal	PCR	Mulheres grávidas	21,9	Lobo <i>et al.</i> , 2016
RDSTP	LAT (32)	Crianças de idade pré-escolar	21,49	Fan <i>et al.</i> , 2006
	LAT (32)	Mulheres grávidas	75,2	Hung <i>et al.</i> , 2007
	LAT (NE)	Homens e mulheres	74,5	Fan <i>et al.</i> , 2007

DAT – teste de aglutinação direta; ELISA – ensaio imunoenzimático; IFAT – teste de imunofluorescência indireta; LAT – teste de aglutinação em látex; NE – não especificado; PCR – reação em cadeia da polimerase. ELFA – teste imunoenzimático por fluorescência (“enzyme linked fluorescent assay”).

* Os testes serológicos foram realizados por mini VIDAS® (Biomérieux, França).

Os cães podem representar um risco de aquisição de infecção para outras espécies, incluindo os seres humanos, pois foram detetados oocistos infetantes de *T. gondii* em fezes de cães, o que se deve à ingestão de oocistos de *T. gondii* após coprofagia (Schaes *et al.*, 2005). Em países onde o cão se destina ao consumo humano este pode ser uma via de

infecção para o homem.

6.2. Quadro clínico e lesional

A infecção por *T. gondii* no ser humano pode ocorrer no período pré ou pós-natal.

A maioria das pessoas infetadas após o parto são assintomáticas, no entanto, algumas desenvolvem doença leve ou, em casos raros, doença sistêmica mais grave (Montoya e Liesenfeld, 2004; Remington *et al.*, 2006).

Uma minoria de pessoas saudáveis, infetadas com *T. gondii* após o nascimento, desenvolve sintomas que geralmente são leves e incluem manifestações como febre, mal-estar e linfadenopatia (Montoya e Liesenfeld, 2004; Remington *et al.*, 2006). No entanto, existem raros casos em que os seres humanos desenvolvem doença grave ou mesmo fatal, incluindo envolvimento pulmonar e multivisceral, possivelmente devido à infecção por estirpes mais virulentas de *T. gondii* (Carme *et al.*, 2002; Demar *et al.*, 2007).

A patologia ocular, nomeadamente a retino-coroidite pode ser devida a infecção congénita ou pós-natal e pode estar associada a uma infecção aguda ou reativação de uma infecção crónica (Montoya e Remington, 1996; Holland, 1999, 2003).

A infecção congénita surge, geralmente, quando a primoinfecção ocorre durante a gravidez (Remington *et al.*, 2006), embora tenham sido relatadas raras exceções em que mulheres infetadas antes da gravidez transmitiram a infecção ao feto, devido, por exemplo, a reativação de uma infecção crónica (Mitchell *et al.*, 1990; Vogel *et al.*, 1996; Minkoff *et al.*, 1997). O risco de infecção congénita é menor quando a infecção materna ocorre no primeiro trimestre (10-15%) e maior quando a infecção ocorre durante o terceiro trimestre (60-90%) (Dunn *et al.*, 1999; Remington *et al.*, 2006). No entanto, a infecção congénita leva, geralmente, a doença mais grave quando ocorre nos primeiros três meses de gestação (Desmonts e Couvreur, 1974; Remington *et al.*, 2006).

A infecção congénita pode levar a uma grande variedade de manifestações no feto e na infância, incluindo aborto espontâneo, hidrocefalia ou microcefalia, calcificações cerebrais, alterações cognitivas e mentais (McAuley *et al.*, 1994; Remington *et al.*, 2006). Crianças assintomáticas ao nascimento podem desenvolver manifestações oculares ou neurológicas mais tarde na vida (Wilson *et al.*, 1980; McLeod *et al.*, 2006).

A encefalite é a apresentação clínica mais comum entre pessoas com SIDA. Geralmente é o resultado da reativação de quistos latentes (Leport *et al.*, 1996; Basavaraju, 2016).

Vários trabalhos de investigação têm-se dedicado ao estabelecimento de correlações entre a infeção por *T. gondii* e as alterações comportamentais como a esquizofrenia, entre outras (Flegr *et al.*, 2002). Os resultados apresentados sugerem uma prevalência mais elevada de anticorpos para *T. gondii* em alguns indivíduos com esquizofrenia (Torrey *et al.*, 2007; Fuglewicz *et al.*, 2017).

7. TRATAMENTO

Todos os fármacos utilizados no tratamento sistémico possuem algum efeito sobre os taquizoítos podendo controlar a infeção ativa, mas não eliminam a infeção crónica, uma vez que não possuem atividade contra os bradizoítos dentro de quistos tecidulares (Davidson, 2000; Dubey, 2010). Como resultado, a terapia sistémica não elimina *T. gondii* dos hospedeiros, nem previne definitivamente a recorrência da infeção, podendo ocorrer novo aparecimento dos sinais clínicos quando o tratamento é descontinuado (Mariuz *et al.*, 1997).

Nos seres humanos, os fármacos mais utilizados são uma combinação de pirimetamina e sulfonamida ou de trimetoprim-sulfonamidas (Davidson e English, 1998; Dubey, 2010). Estes fármacos inibem a produção de ácido fólico necessário para a replicação de *T. gondii* (Davidson, 2000; Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004). A pirimetamina é potencialmente teratogénica e não deve ser usada no primeiro trimestre da gravidez. Esta, produz depressão reversível gradual da medula óssea (Montoya e Remington, 2008).

Infelizmente, os gatos toleram mal as combinações de sulfonamidas e pirimetamina, contribuindo para o desenvolvimento de efeitos colaterais gastrointestinais e supressão da medula óssea (Dubey, 1977; Davidson, 2000; Lappin, 2010).

Outros fármacos têm-se demonstrado promissores no tratamento da toxoplasmose como a clindamicina, espiramicina, azitromicina, roxitromicina, ciclosporina A, atovaquona, e o ponazuril (Mitchell *et al.*, 2006).

Entre esses agentes, o cloridrato de clindamicina é o mais usado para a toxoplasmose felina e canina e, apesar dos efeitos colaterais gastrointestinais graves em seres humanos, o mesmo não foi observado nestas espécies animais (Davidson, 2000). A clindamicina reduz a

gravidade da infeção aguda, diminuindo o número de quistos nos tecidos e parece reduzir a gravidade das lesões em humanos com toxoplasmose ocular (Engstrom *et al.*, 1991; Lakhapal *et al.*, 1983).

A espiromicina apesar de possuir uma menor eficácia quando comparada com a sulfadiazina e a pirimetamina, pode ser utilizada durante a gestação, pois conduz a elevadas concentrações na placenta (Dubey, 2010).

O ponazuril, fármaco aplicado no tratamento da mieloencefalite protozoária equina provocada por *Sarcocystis neurona* em cavalos, tem sido experimentalmente testado para o tratamento de toxoplasmose felina. (Mitchell *et al.*, 2004; Dabritz *et al.*, 2007; Lappin, 2010).

No tratamento da toxoplasmose em ovelhas, as sulfonamidas e a pirimetamina são os fármacos de eleição, atuando sinergicamente e reduzindo a mortalidade fetal (Buxton *et al.*, 1993; Montoya e Remington, 2008). No entanto, é importante ter em atenção a sua toxicidade a nível da medula óssea, suplementando com ácido fólico (Fenner, 1984; Martin e Illa, 2003; Montoya e Liesenfeld, 2004).

8. PREVENÇÃO E CONTROLO

Os hospedeiros definitivos como o gato são a chave da transmissão do parasita, por isso devem ser tomadas medidas preventivas, sendo recomendável alimentá-los exclusivamente com dietas comerciais ou alimentos bem passados, evitando carne, ossos ou vísceras cruas (Lucas *et al.*, 1999); reduzir o acesso ao exterior e o contacto com outras espécies animais e resíduos urbanos e, controlar a população de felinos em propriedades agrícolas (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2010). Precauções adicionais devem ser tomadas durante terapias imunossupressoras sendo portanto de evitar o tratamento imunossupressor de gatos cujos proprietários sejam indivíduos que pertençam a grupos de risco (Tenter *et al.*, 2000).

Devemos ter em atenção a aplicação de medidas higiénicas e de maneo adequado, bem como o devido confinamento dos animais de produção (Tenter *et al.*, 2000; Villari *et al.*, 2009). As instalações devem ser sempre mantidas limpas e livres de roedores, aves, insetos, gatos e cães (Gajadhar *et al.*, 1998; Villari *et al.*, 2009).

Toda a água e o alimento devem estar bem armazenados de modo a evitar a contaminação por oocistos (Dubey, 1994; Gajadhar *et al.*, 1998; Dubey, 2004).

A prevenção da infeção durante a gestação é importante para a prevenção do aborto. Assim, antes e durante o período da gestação, deve-se evitar o contacto entre pequenos ruminantes e os gatos (Dubey *et al.*, 1990; Dubey, 1994). As membranas fetais e fetos abortados devem ser enterrados ou, de preferência, incinerados (Dubey *et al.*, 1986; Dubey, 1994; 2010).

A suinicultura em regime intensivo associada a medidas de higienização e a programas de controlo, permitiram a redução drástica das infeções por *T. gondii* em suínos nas últimas décadas (Kijlstra *et al.*, 2004; Villari *et al.*, 2009). Os porcos não devem consumir alimentos crus e os que morrem devem ser logo removidos da exploração de modo a evitar o canibalismo (Dubey, 1990; Hill *et al.*, 2010).

Uma vigilância no abate de animais no matadouro em combinação com estratégias de prevenção da infeção iria garantir maior segurança no consumo de carne (Kijlstra *et al.*, 2004).

De modo a evitar a infeção da fauna silvática é necessário incineração ou enterro das vísceras e carcaças dos animais caçados (Dubey e Jones, 2008). Para evitar a disseminação de oocistos em jardins zoológicos, os felídeos silváticos devem ser alojados num edifício separado dos outros animais (Dubey, 1994, 2010), uma vez que também são considerados hospedeiros definitivos. É necessário a utilização de vestuário de proteção (roupa, luvas, botas e mascaras descartáveis) na realização diária da remoção da cama e das fezes dos felídeos. Estas últimas, por sua vez devem ser incineradas antes que os oocistos esporulem. Todos os materiais potencialmente contaminados, como os usados na limpeza das jaulas, devem ser submetidos ao aquecimento a 70°C durante pelo menos 10 minutos (Dubey, 1994, 2010).

As medidas para reduzir o risco de infeção humana incluem boas práticas higiénicas como a lavagem das mãos com água e sabão após o contacto com o solo ou superfícies e materiais que contactaram com carne crua; contacto com cães, gatos ou com as suas fezes (Hill e Dubey, 2002; Frenkel *et al.*, 2003) e, a limpeza diária da liteira do gato, de preferência por pessoas que não sejam mulheres gestantes (Foulon *et al.*, 1994; Hill e Dubey, 2002). Na limpeza da liteira é ainda necessário o uso de luvas durante o processo e a desinfecção dos objetos em contacto a 70°C e detergente (Cook *et al.*, 2000; Tenter *et al.*, 2000).

Deve ser realizada a lavagem de vegetais e de frutas que são consumidos crus (Hill e Dubey, 2002) e deve-se evitar o consumo de água não tratada (Dubey, 2004).

Os consumidores devem ser informados tanto sobre o processamento térmico adequado da carne de porco quanto sobre o perigo potencial de alguns produtos de carne típicos quando não forem devidamente curados (Villari *et al.*, 2009).

É aconselhável proceder-se à pasteurização ou fervura do leite cru, em particular o leite de cabra (Tenter *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2000). Deve ser proibida a entrada de gatos em ambientes partilhados com crianças, pois a geofagia é um fator de risco (Stagno *et al.*, 1980; Tenter *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2012).

Deve-se proceder à congelação da carne a uma temperatura interna de -12°C durante 24 horas para destruição dos quistos tecidulares (Kotula *et al.*, 1991; Dubey, 2010), e a carne de qualquer animal deve ser cozinhada até que a temperatura interna atinja 67°C e no mínimo durante 3,5 minutos, antes de ser consumida (Dubey *et al.*, 1990; Dubey e Jones, 2008). Note-se que o microondas não destrói de forma fiável o parasita (Kotula *et al.*, 1991).

A indústria da carne também deve estar ciente da possível presença do parasita nas matérias-primas utilizadas para a preparação de salsichas e vários outros produtos, devendo evitar-se a degustação de carne enquanto se cozinha ou se tempera enchidos caseiros (Kotula *et al.*, 1991).

Pessoas com trabalhos de risco como talhantes, magarefes, e trabalhadores em explorações e restaurantes devem estar informados sobre as práticas de prevenção (Villari *et al.*, 2009).

Tendo em conta que as mulheres gestantes e os indivíduos imunodeprimidos são as pessoas de maior risco, o seu estado imunitário para a infeção deve ser conhecido. Em caso de impossibilidade na realização dos testes serológicos, admite-se como potencialmente em risco (Tenter *et al.*, 2000).

A decisão de administrar profilaxia a todos os doentes que receberam transplantes, deve ter como base a seroprevalência na população em geral num determinado país e o órgão a ser transplantado (Baran *et al.*, 2006).

9. VACINAÇÃO

Um dos objetivos da vacinação inclui a redução do número de quistos em animais para consumo. A Toxovax[®] vacina viva constituída por taquizoítos da estirpe atenuada S48, foi originalmente desenvolvida para uso em ovinos para diminuir a formação de quistos tecidulares e danos fetais (Buxton *et al.*, 1993; Hiszczyńska-Sawicka *et al.*, 2014). Na prevenção da eliminação de oocistos por gatos, foi desenvolvida uma vacina contendo bradizoítos vivos da estirpe mutante T-263 de *T. gondii*, bloqueando o ciclo sexual do parasita após administração oral, prevenindo a libertação de oocistos (Freyre *et al.*, 1993).

Nos últimos anos, observou-se progressos significativos no desenvolvimento de vacinas de *T. gondii* com novos antigénios, adjuvantes e estratégias de imunização. Os candidatos a vacina variaram de antigénios recombinantes (únicos, combinados ou quiméricos) a péptidos sintéticos, ADN ou ARN e micropartículas como por exemplo, nanopartículas ou exossomos (Kur *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Joachim, 2016).

Geralmente, as vacinas inativadas contra *T. gondii* não são suficientemente eficazes (Kur *et al.*, 2014; Joachim, 2016). Em contrapartida, as vacinas vivas induzem uma imunidade protetora notável, mas não são aceitáveis para uso em humanos. Adicionalmente, a imunidade de uma vacina viva é significativamente influenciada pelo seu grau de atenuação, o que introduz uma preocupação de segurança devido ao risco de reversão de uma estirpe mais virulenta (Liu *et al.*, 2012). As vacinas vivas atenuadas têm benefícios adicionais porque induzem imunidade celular e humoral protetora simulando a infeção natural sem causar doença (Fereig e Nishikawa, 2016); e são capazes de mobilizar uma resposta de células T CD8 + restrita ao MHC classe I, que é considerada a principal resposta causada por parasitas (Jongert *et al.*, 2010).

Aproximadamente 1360 famílias de proteínas especializadas de *T. gondii* foram descritas como potenciais candidatas a vacinas (Wasmuth *et al.*, 2009), incluindo o antigénio de superfície (“surface antigen”- SAG), antigénio de roptrias (“rhoptry antigen”- ROP), antigénios de micronema (“microneme antigens”- MIC) e antigénio de grânulo denso (“dense granule antigen” - GRA). Embora as vacinas proteicas tenham pouca ou curta imunidade e funções de proteção, é possível superar esses problemas ao usar veículos adequados ou adjuvantes apropriados para induzir uma resposta imune protetora e duradoura (Liu *et al.*, 2012; Fereig e Nishikawa, 2016).

As vacinas de ADN possuem vantagens distintas: promovem a expressão específica de um antígeno codificado por vacina por células hospedeiras e desencadeia respostas imunitárias celulares e humorais (Wolff e Budker, 2005; Carvalho *et al.*, 2010), bem como a facilidade de produção, baixo custo, estáveis a altas temperaturas e seguras.

Em geral, as vacinas de ADN provaram ser eficazes na indução de respostas imunitárias em animais pequenos (por exemplo, hamsters), mas a indução de imunidade em animais grandes (por exemplo, ovelhas e cabras) tem sido menos eficiente. Para melhorar as respostas imunitárias, novos adjuvantes e citoquinas estão a ser incorporados (Carvalho *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, as vacinas de múltiplos epítomos, incluindo epítomos de células T e B, tornaram-se um conceito interessante na indução de respostas imunitárias celulares e humorais, bem como imitam com precisão o processamento e a apresentação do Ag durante uma infeção natural e, portanto, induzem uma imunidade protetora mais eficiente do que as vacinas de proteínas inteiras (Skwarczynski e Toth, 2016).

Ao longo dos tempos têm surgido novas apostas na vacinação, como os exossomos que visam, através do seu envolvimento na imunidade inata e adaptativa, construir uma vacina alternativa eficaz contra a toxoplasmose congénita (Carrière *et al.*, 2016), ou como os hidratos de carbono (Astronomo e Burton, 2010; Gotze *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2015).

Recentemente, Chahal *et al.* (2016) desenvolveram uma plataforma vacinal de nanopartículas de dendrímero em que os antígenos são codificados por replicações de mRNA encapsulados (Chahal *et al.* 2016).

A ausência de uma vacina eficaz no controlo e prevenção da infeção por *T. gondii* em humanos e animais remete para a possibilidade mais viável de reduzir a infeção, que reside nas medidas higiénicas e de manejo descritas no ponto 8 (Wolf, 2003; Dubey e Jones, 2008; Elmore *et al.*, 2010).

PARTE II – COMPONENTE EXPERIMENTAL

1. INTRODUÇÃO

Estudos serológicos sobre a infeção por *Toxoplasma gondii* em São Tomé e Príncipe são escassos, estando apenas disponíveis pesquisas realizadas em seres humanos.

Sendo as condições climáticas da República Democrática de São Tomé e Príncipe (RDSTP) adequadas para a esporulação de oocistos de *T. gondii*, devido ao clima quente e húmido (Cenci-Goga *et al.*, 2011), parece provável que a exposição a um meio ambiente incluindo água e alimentos contaminados por oocistos de *T. gondii* seja um dos fatores mais importantes associados à infeção por este protozoário neste país (Fan *et al.*, 2012). Assim, torna-se essencial a realização de mais estudos de modo a atualizar e complementar os estudos anteriores realizados na RDSTP.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a seroprevalência de infeção por *T. gondii* em animais domésticos de São Tomé; tendo sido efetuadas recolhas de sangue em suínos, ovinos, caprinos e bovinos durante o período de estágio curricular.

A primeira fase o trabalho consistiu no acompanhamento da atividade médico-veterinária no Matadouro Central de São Tomé e em várias explorações pecuárias, de agosto a outubro de 2017, procedendo-se à recolha das amostras de sangue.

A segunda fase deste estudo consistiu na realização do teste de aglutinação modificado (“modified agglutination test” – MAT) no Laboratório de Parasitologia da Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro (UTAD). O MAT é um teste de serodiagnóstico, que tem sido bastante utilizado para estudos epidemiológicos em diferentes espécies. Este teste é um método sensível, específico e simples de realizar, o que reduz as variações inerentes ao técnico. Além disso, encontra-se largamente disponível e o risco para o operador é reduzido pois utiliza taquizoítos inativados (Desmonts e Remington, 1980; Dubey e Desmonts, 1987).

O segundo período de estágio foi realizado na África do Sul, Cidade do Cabo na Society for the Prevention of Cruelty to Animals (SPCA), tendo como objetivo acompanhar o trabalho clínico num centro hospitalar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo definir valores de seroprevalência para *T. gondii* em bovinos, ovinos, caprinos e suínos da ilha de São Tomé; e identificar os possíveis fatores de risco associados com a infeção.

Deste modo pretende-se enriquecer e atualizar os conhecimentos sobre esta zoonose a nível mundial, pois os estudos de infeção por este protozoário nesta região do globo são escassos.

2.2. Objetivos específicos

Na definição do estudo, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Realizar o teste serológico MAT para o diagnóstico da infeção por *T. gondii*;
- Identificar as variáveis associadas à infeção por *T. gondii*;
- Comparar os resultados obtidos com outros estudos;
- Sugerir e alertar para as medidas profiláticas que podem ser implementadas de modo a prevenir esta infeção;
- Incentivar a realização de mais estudos, com o objetivo de obter informação atualizadas e relevante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caraterização da área de estudo

O estudo presente nesta dissertação de mestrado foi desenvolvido na ilha de São Tomé, pertencente à RDSTP, um estado insular situado junto a linha do Equador, no Golfo da Guiné, distanciando-se 300 km da Costa Ocidental Africana (Figura 9). Este arquipélago é constituído por duas ilhas principais, a ilha de S. Tomé e a ilha do Príncipe, e alguns ilhéus adjacentes perfazendo uma área total de 1001 km² de extensão, fazendo de São Tomé e Príncipe o segundo menor país africano (Neves, 2009), a seguir à República das Seychelles. Este país, segundo o Fundo de População das Nações Unidas ("United Nations Population Fund" - UNFPA) apresentava 200.000 habitantes em 2017.



Figura 9. Localização geográfica de São Tomé e Príncipe (Fonte: <https://olimpiadas.uol.com.br/2008/paises-participantes/sao-tome-e-principe.jhtm>, acesso a 10 de maio de 2018).

A ilha de São Tomé foi descoberta a 21 de dezembro de 1470 por Pero Escobar e João de Santarém, navegadores portugueses, seguindo-se a ilha do Príncipe a 17 de Janeiro do ano seguinte, sendo então colónia de Portugal até a sua independência a 12 de Julho de 1975 (Oliveira, 1993).

Este arquipélago apresenta um clima próprio das regiões intertropicais, impondo a existência de duas estações no ano: a estação das chuvas, de outubro a maio, e a estação seca ou “gravana”, de junho a setembro (Loureiro, 2005). Não só o clima quente mas também a qualidade dos solos e a quantidade das “águas” transformaram “as ilhas de São Tomé e Príncipe em verdadeiros jardins tropicais em que a exuberância e riqueza da vegetação chegam a ser opressivas” (Agência Geral do Ultramar, 1969).

A RDSTP é composta por sete distritos, sendo seis em São Tomé (Água Grande, Cantagalo, Caué, Lembá, Lobata e Mé-Zochi) e um na ilha do Príncipe (Pagué). É no distrito de Água Grande que fica a capital do país, São Tomé, e embora seja o menor dos sete, este distrito é o mais populoso (Neves, 2009).

Na Figura 10 podemos observar todo o território da ilha de São Tomé, compreendendo as regiões montanhosas, as planícies bem como os rios.

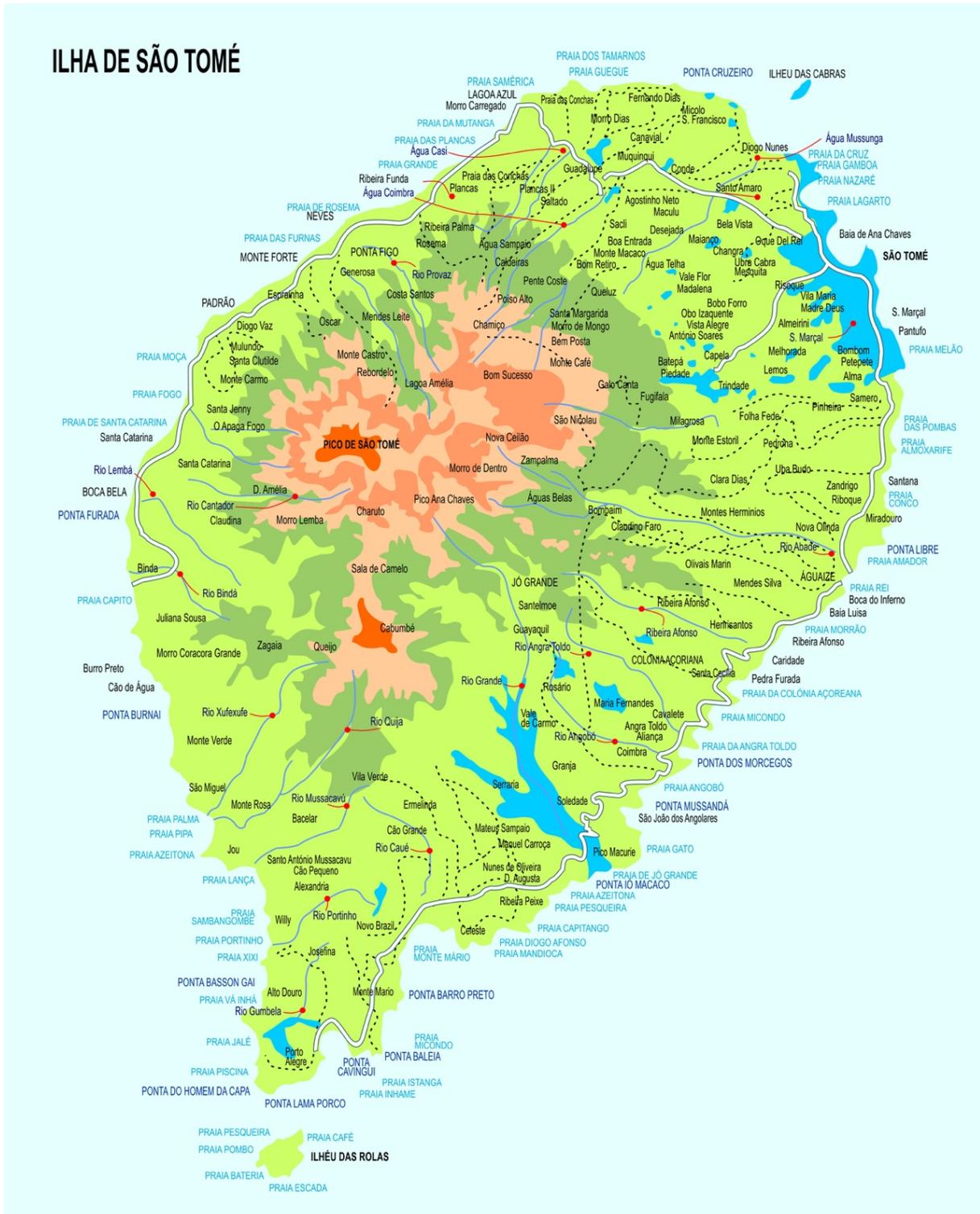


Figura 10. Mapa da Ilha de São Tomé (Fonte: <https://arleciosoares13.wordpress.com>, acesso a 28 de setembro de 2017)

Esta ilha alberga uma das maiores coleções de flora e fauna do mundo, existindo espécies únicas no mundo inteiro.

3.2. Ficha epidemiológica

De modo a caracterizar as amostras foi elaborado um quadro epidemiológico (Anexo I), contendo informações sobre as seguintes variáveis independentes: género (feminino ou masculino), idade (jovem ou adulto), raça, fase reprodutiva (gestante ou não) e proveniência dos animais (área geográfica).

Foram recolhidas amostras de três áreas da ilha de São Tomé, norte, centro e sul devidamente delimitadas com base na sua localização geográfica (Figura 11). A zona norte compreende os distritos de Lembá (a verde) e Lobata (a amarelo claro); a zona centro os distritos de Mé-Zóxi e Água Grande (cidade São Tomé); e a zona sul os distritos de Cantagalo (a amarelo) e Caué (a cor-de-rosa).



Figura 11. Mapa da RDSTP, delimitação dos distritos da ilha de São Tomé (Adaptada de www.mapsofworld.com, acesso a 28 de setembro de 2017).

Foi também registada a informação relativa ao exame físico dos animais, apresentando todos boa condição corporal.

As amostras de sangue foram obtidas no matadouro e através de deslocações a explorações, todos os testados tinham acesso ao exterior e a áreas de pasto (Figura 12).

Note-se que as recolhas foram elaboradas de forma aleatória, dentro de cada exploração pecuária e no Matadouro Central de São Tomé.



Figura 12. Explorações pecuárias de São Tomé, com acesso ao exterior. Original.

3.3. Contenção dos animais

As técnicas de contenção basearam-se fundamentalmente na contenção física dos animais, procurando sempre minimizar o seu stresse.

De acordo com as espécies, optou-se pelo método de contenção mais adequado: no caso dos suínos, optou-se pela recolha no matadouro durante o sangramento; nos bovinos a contenção foi manual e feita com o auxílio de mangas, arganel e cordas (Figura 13); nos pequenos ruminantes utilizou-se apenas a contenção manual sem o auxílio de equipamento (Figura 14).



Figura 13. Contenção em bovinos na manga. Zona norte de São Tomé. Original.

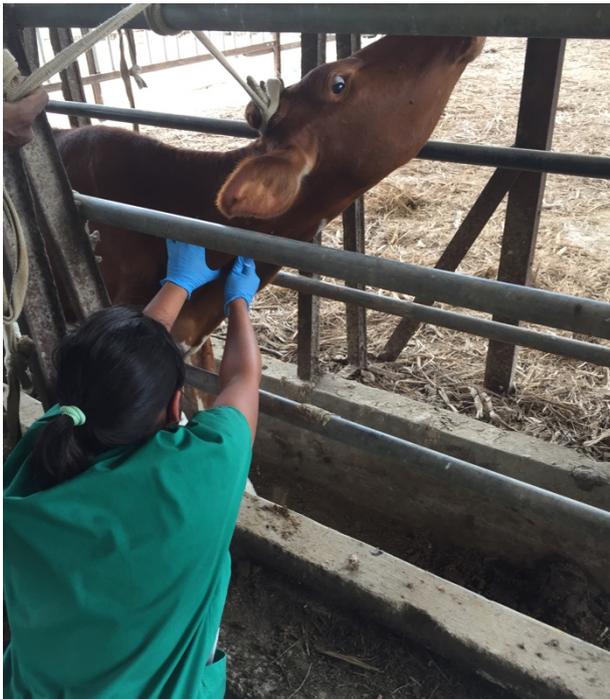


Figura 14. Contenção manual em caprino. Zona norte de São Tomé. Original.

3.4. Animais amostrados

3.4.1. Amostras de sangue e procedimento

Após a contenção dos animais, procedeu-se de forma metódica e organizada ao exame físico e à colheita de sangue. Para a recolha das amostras foi obtida autorização prévia da Direção de Pecuária de São Tomé e Príncipe (Anexo II), bem como dos proprietários das explorações.



Foi feita a assepsia local com algodão embebido em álcool a 70°. Recorrendo a seringas descartáveis de 5 ou de 10 ml, e a agulhas de 18G ou 20G, dependendo do porte do animal, obtiveram-se 3 a 5 ml de sangue por venopunção da veia jugular (Figura 15).

Figura 15. Recolha de sangue em bovino. São Tomé. Original.

As amostras de sangue foram devidamente acondicionadas em tubos, previamente identificados e sem anticoagulante, que foram mantidos à temperatura ambiente de modo a ocorrer a retração do coágulo. Posteriormente, foram centrifugadas a 2500 rpm, durante dez minutos, no Laboratório Central de Diagnóstico Veterinário localizado na cidade de São Tomé. Com o auxílio de pipetas de Pasteur descartáveis retirou-se o soro de cada amostra e colocou-se em tubos de plástico (Eppendorf[®]), previamente identificados, sendo congeladas a -18°C. Posteriormente, as amostras foram transportadas, via aérea, para Portugal tendo o serodiagnóstico sido realizado no Laboratório de Parasitologia da UTAD.

3.5. Exame serológico

Para a pesquisa de anticorpos específicos foi realizado o MAT, utilizando um teste comercial – Toxo-Screen DA[®] (bioMérieux, Lyon, França) (Figura 16) e de acordo com as instruções do fabricante.

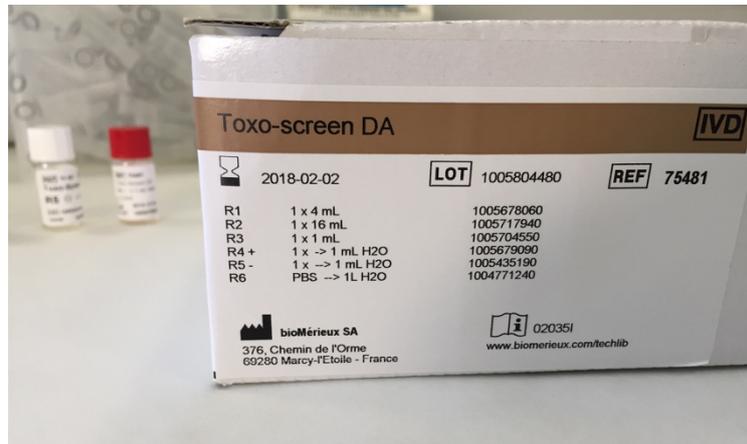


Figura 16. Toxo-Screen DA[®] (bioMérieux). Original.

Este método, de elevada especificidade e sensibilidade, indica a presença de uma infecção prévia uma vez que deteta a presença de IgG.

Os resultados obtidos pelo MAT foram expressos como um título de anticorpos, ou seja, o inverso da maior diluição à qual a aglutinação foi ainda visível após 5 a 18 horas de incubação à temperatura ambiente.

Os soros foram testados para as diluições de 1:20 e 1: 400 no caso dos suínos, ovinos e caprinos; e de 1:100 e 1: 400 no caso dos bovinos, tendo-se optado por um limiar de positividade (“cut-off”) de 20 para suínos e pequenos ruminantes (Dubey *et al.*, 1995; Sousa *et al.*, 2009) e de 100 para os bovinos (Dubey e Jones, 2008), de modo a maximizar a sensibilidade e especificidade do teste (Lopes *et al.*, 2013).

3.5.1. Material e métodos

3.5.1.1. Material

Para a realização do trabalho de pesquisa, foi necessário:

- Câmara de fluxo laminar
- Placas de microtitulação com fundo em U
- Pontas descartáveis

- Folha transparente autocolante
- Soros dos animais a testar
- Reagentes (Figura 17)
- Micropipetas: multicanal, simples e de repetição (Figura 18)
- Agitador de placas (Figura 19)
- Espelho de aumento (Figura 20).

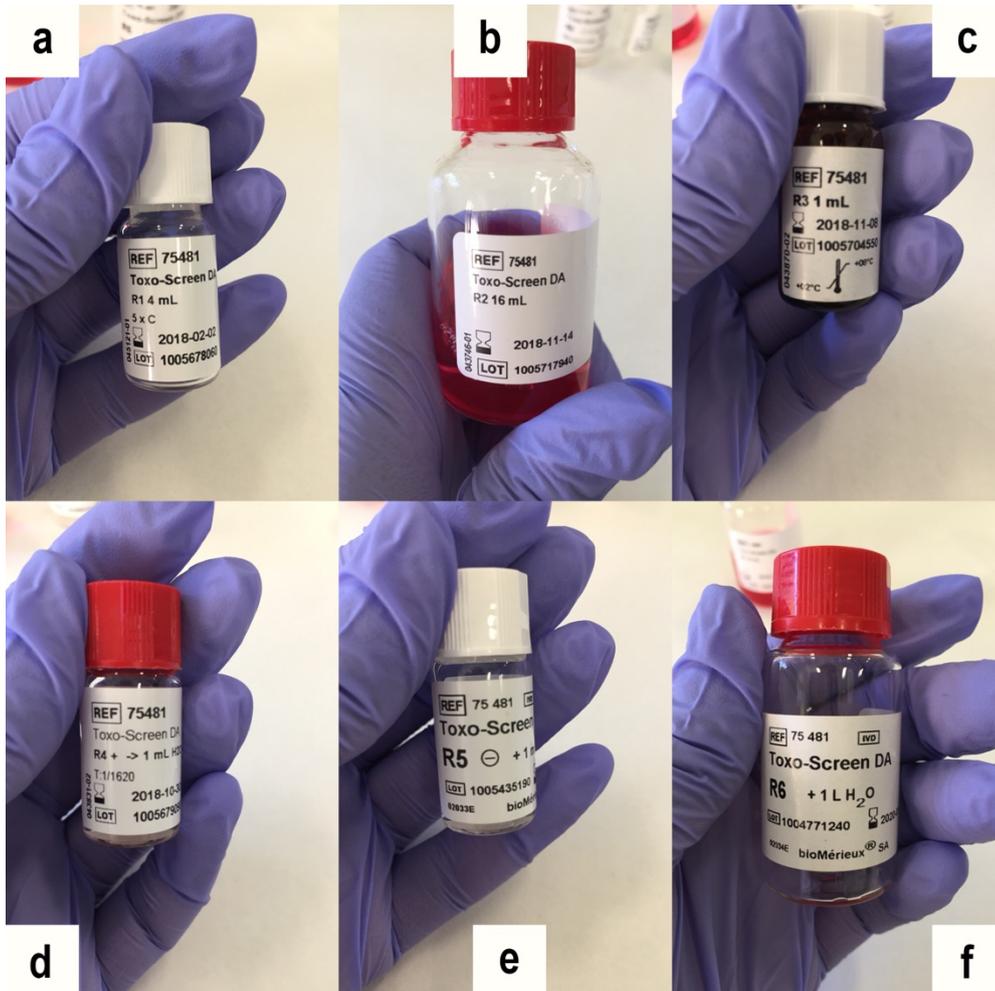


Figura 17. Reagentes incluídos no teste comercial Toxo-Screen DA® (bioMérieux). Original.:

- Antigénio: suspensão de taquizoítos em formol, estirpe RH Sabin cultivada em rato;
- Diluyente do antigénio: tampão albumina – solução tamponada de ácido bórico de cor vermelha BABS (pH 8,95) azida sódica 1 g/l;
- 2-Mercaptoetanol (2-ME) (14,2 mol/l);
- Soro de controlo positivo: soro de cabra + mertiolato de sódio 0,1g/l;
- Soro de controlo negativo: soro de cabra + mertiolato de sódio 0,1g/l;
- Solução tampão de fosfato NaCl (“phosphate buffered solution” – PBS).

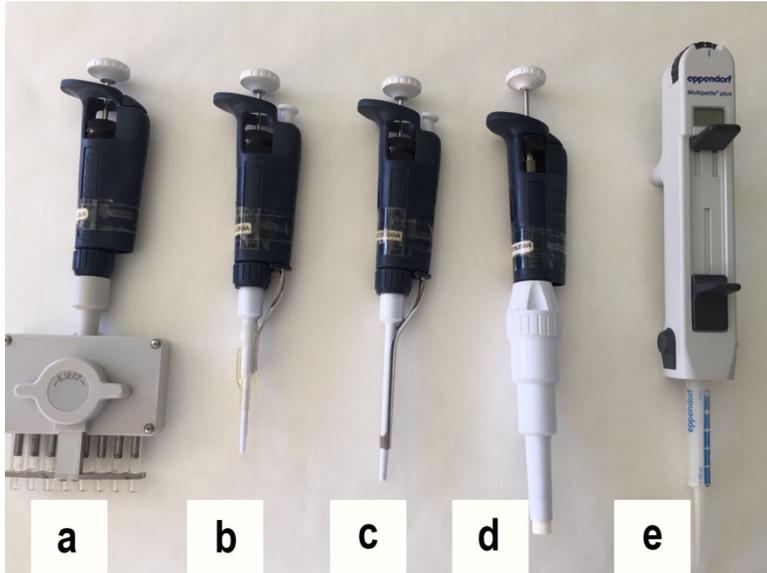


Figura 18. Micropipetas. Original.

Legenda:

- a) Micropipeta multicanal de oito pontas;
- b) Micropipeta simples (2 µl);
- c) Micropipeta simples (10 µl);
- d) Micropipeta simples (5000 µl);
- e) Micropipeta de repetição.



Figura 19. Agitador de placa. Original.



Figura 20. Espelho de aumento. Original.

3.5.1.2. Metodologia laboratorial

A reconstituição dos reagentes foi realizada de acordo com as instruções do fabricante:

- a) Controlo positivo: reconstituir com 1 ml de água destilada estéril.
- b) Controlo negativo: reconstituir com 1 ml de água destilada estéril.
- c) PBS: reconstituir com 1 litro de água destilada estéril.
- d) 2-Mercaptoetanol: 0,35 ml de 2-ME e 25 ml de PBS, de modo a obter 0,2mol/l. Frasco devidamente protegido da luz (Figura 21).
- e) Suspensão de taquizoítos em formol estirpe RH Sabin cultivada em rato, deve ser agitada vigorosamente, confirmando a ausência de sedimentação. De seguida, diluiu-se esta suspensão para 1/5 com solução tampão de albumina. O tampão de albumina possui coloração vermelha e confere ao teste a sua cor característica facilitando a leitura.



Figura 21. Frasco de 2-ME, protegido com papel de alumínio. Original.

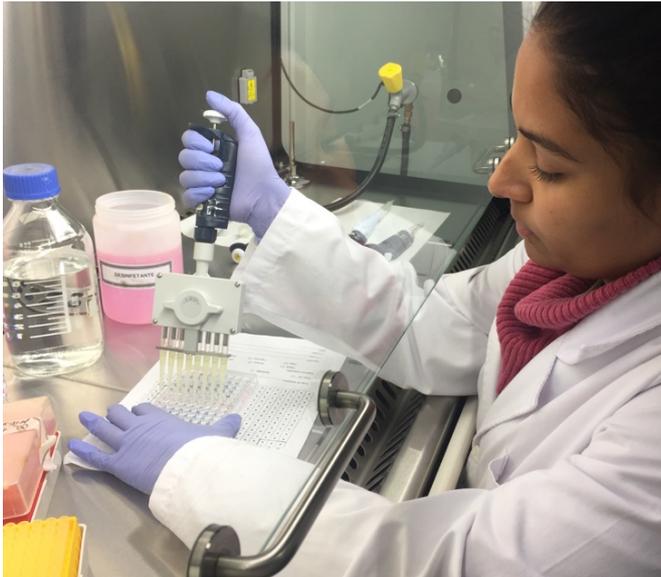
Para o trabalho laboratorial, os soros foram testados para diluições de:

- 1:20 (excluindo bovinos);
- 1:100 (bovinos);
- 1:400 (todas as espécies).

Os controlos positivo e negativo, assim como o controlo de antigénio, foram incluídos em cada placa.

Diluição 1:20:

- a) Identificação das amostras na placa de microtitulação;
- b) Com a micropipeta multicanal de oito pontas introduziu-se 22,5 µl de PBS em cada poço (Figura 23). Adicionou-se de seguida, com a micropipeta simples, 2,5 µl de cada soro no poço previamente identificado, estabelecendo uma diluição inicial de 1:10.



c) Posteriormente adicionou-se a cada poço 25 μ l de 2-ME, completando assim uma diluição de 1:20.

d) Por fim foi colocado 50 μ l de antígeno em cada poço com auxílio da micropipeta de repetição.

Figura 22. Pipetagem de PBS com micropipeta multicanal de oito pontas. Original.

e) De seguida procede-se à homogeneização das placas no agitador de placas (Figura 23).

f) Após a homogeneização as placas foram incubadas durante 5 a 18 horas à temperatura ambiente (18 a 25°C), não sujeitas a vibrações ou a eventual desidratação.

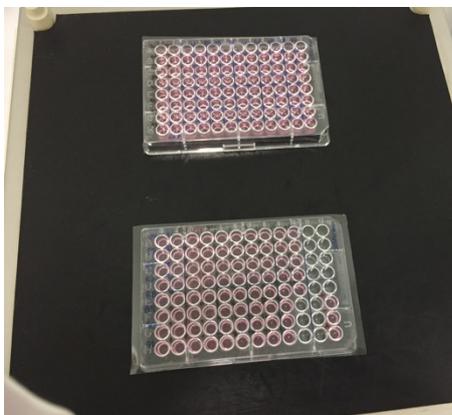


Figura 23. Placas de diluição no agitador de placa. Original.

Diluição 1:100

a) Identificação e preparação de duas placas: placa de diluição e placa de leitura.

b- Na placa de diluição colocou-se 49 μ l de PBS em todos os poços, com o auxílio da micropipeta multicanal, e posteriormente 1 μ l de soro em cada um dos poços previamente identificados, utilizando a micropipeta simples de 2 μ l, perfazendo assim uma diluição de 1:50.

diluição de 1:50.

c) Retirou-se 25 μ l da diluição 1:50 e colocou-se na placa de leitura, com a disposição dos soros idêntica à da placa de diluição.

d) Adicionou-se 25 μ l de 2-ME em todos os poços, completando assim uma diluição de 1:100.

e) Por fim adicionou-se 50 μ l de Ag em todos os poços.

Repetição da fase e) e f), mencionadas na diluição de 1:20.

Os soros positivos para as diluições 1:20 e 1:100 foram posteriormente testados para a diluição de 1:400.

Diluição 1:400:

a) Identificação e preparação de duas placas: placa de diluição e placa de leitura.

b) Na placa de diluição colocou-se 199µl de PBS em todos os poços (Figura 23) e 1µl de soro (cada um no poço determinado), formando uma diluição de 1:200.

c) Retirou-se 25 µl da diluição de 1:200 e colocou-se em cada poço da placa de leitura com a disposição dos soros idêntica à da placa de diluição.

d) Posteriormente adicionamos 25 µl de 2-ME em cada poço, completando assim uma diluição de 1:400.

e) No final, adicionamos 50 µl de Ag em todos os poços.

Repetição da fase e) e f), mencionadas na diluição de 1:20.

No poço destinado ao controlo do antigénio foi apenas adicionado 25 µl de PBS, 25 µl 2-ME e 50 µl de antigénio.

3.5.2. Leitura e interpretação dos resultados

De acordo com os critérios de leitura e interpretação dos resultados descritos por Desmonts e Remington (1980), a leitura das placas deve ser realizada num ambiente com luz natural, e após 5 a 18 horas de incubação. Neste trabalho procedeu-se à leitura após 15 horas de incubação (Figura 24 e Figura 25).

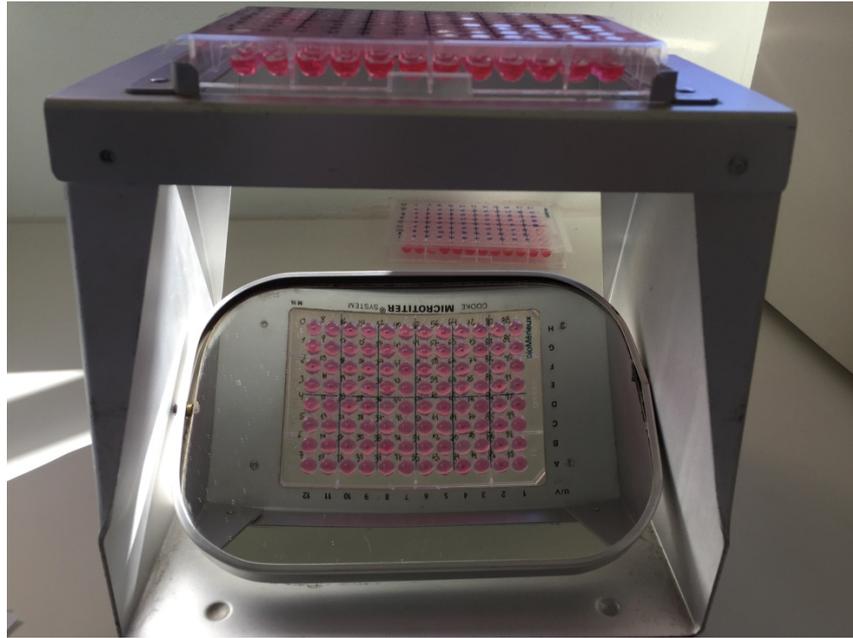


Figura 24. Observação dos resultados, com o uso do espelho de aumento. Original.

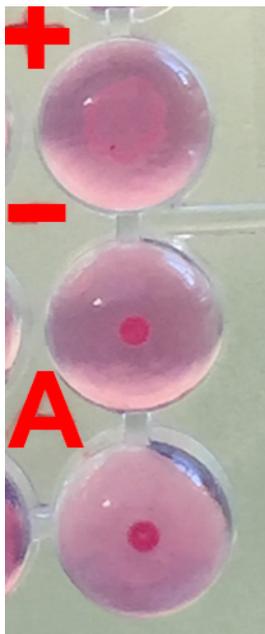


Figura 25. Resultados controle: (+) controle positivo, (-) controle negativo, (A) antigénio. Original.

Os soros considerados como tendo um resultado positivo foram aqueles em que se observou a aglutinação do antigénio, cobrindo pelo menos 50% do fundo do poço (Figura 26).



Figura 26. Resultados positivos. Original.

Como resultado negativo foram considerados os casos em que se deu a sedimentação de taquizoítos em forma de botão bem definido (Figura 27a), ou nos casos em que se visualizava um anel que cobria menos de 50% do fundo do poço (Figura 27b).



Figura 27. Resultados negativos. Original.

3.6. Análise estatística

Os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher foram utilizados para comparar proporções, de modo a avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas em relação à presença de anticorpos para *T. gondii* nos animais analisados de acordo com as diversas variáveis independentes referidas no ponto 3.2.

Um valor de probabilidade (p) $<0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo (Petrie e Watson, 2013).

As variáveis para as quais foi demonstrada uma diferença significativa entre grupos foram selecionadas para a análise de regressão logística múltipla, de modo a identificar possíveis fatores de risco para a seroprevalência, calculando-se a razão de produtos cruzados (“ods ratio” – OR) e os seus intervalos de confiança (IC) a 95%.

As análises foram realizadas com o programa IBMS SPSS Statistics 21.0.

4. RESULTADOS

4.1. Distribuição dos animais incluídos no estudo

No presente estudo foram testados: 48 (13,9%) bovinos, 98 (28,3%) ovinos, 97 (28,0%) caprinos e 103 (29,8%) suínos (Gráfico 1).

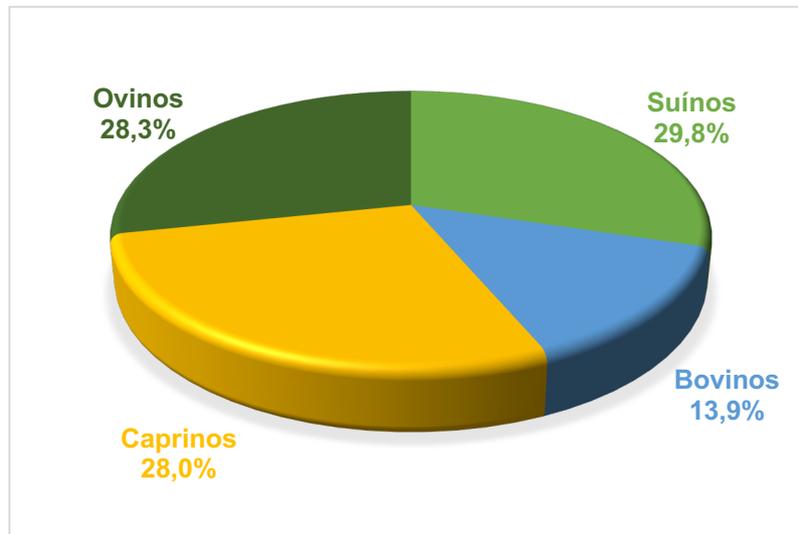


Gráfico 1. Distribuição do número total de animais incluídos no estudo de acordo com a espécie.

4.1.1. Distribuição dos bovinos incluídos no estudo

Verificou-se que 13,9% (48/346) das amostras recolhidas eram provenientes de bovinos, das quais 93,8% (45/48) pertenciam a animais do género feminino e 6,2% (3/48) do género masculino (Gráfico 2).

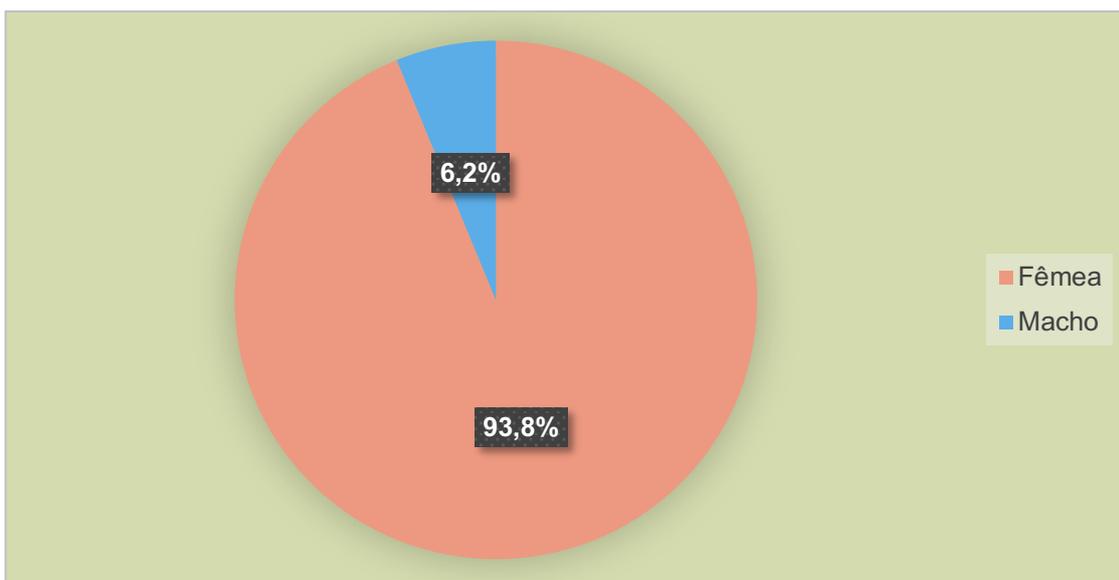


Gráfico 2. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com o género.

Adicionalmente, as fêmeas foram distribuídas com base no seu estado reprodutivo: 24,4% (11/45) sem procriação prévia (SPP), 17,8% (8/45) com procriação prévia (CPP), 13,3% (6/45) gestantes e 44,4% (20/45) o seu estado reprodutivo não se encontrava definido (sem estado reprodutivo definido - SED) (Gráfico 3).

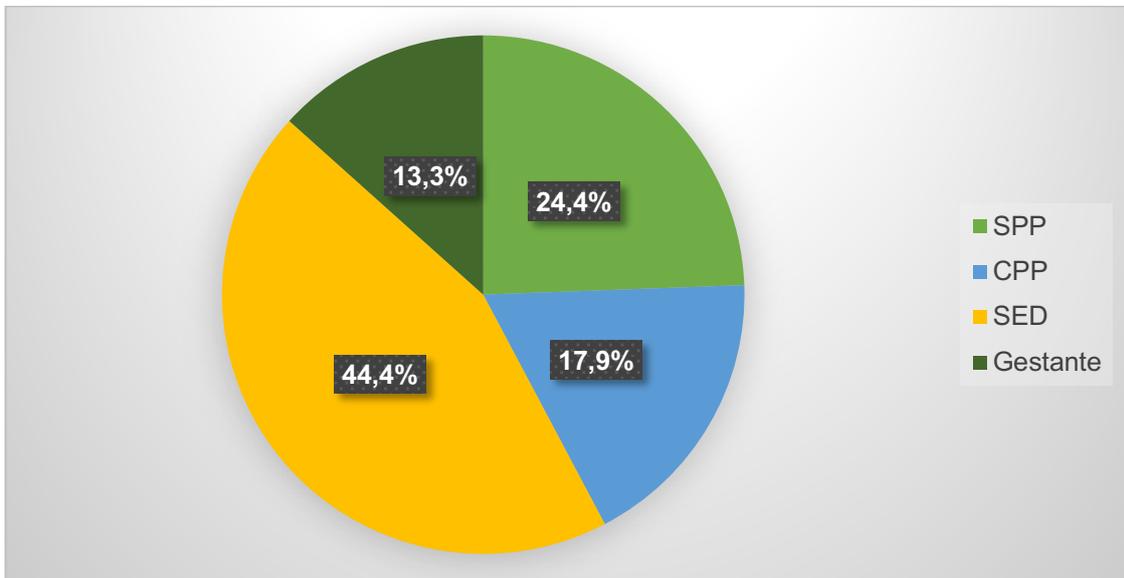


Gráfico 3. Distribuição dos bovinos fêmeas em estudo de acordo com o estado reprodutivo.

*Devido a arredondamentos a uma casa decimal somatório dá 99,9%, e não 100%.

Na variável idade, os animais foram agrupados em dois grupos etários, jovem e adulto, tendo como limite o começo da fase reprodutiva. Assim, dos animais testados 25% (12/48) eram jovens e 75% (36/48) adultos, verificando-se que a maioria dos animais era adulto (Gráfico 4).

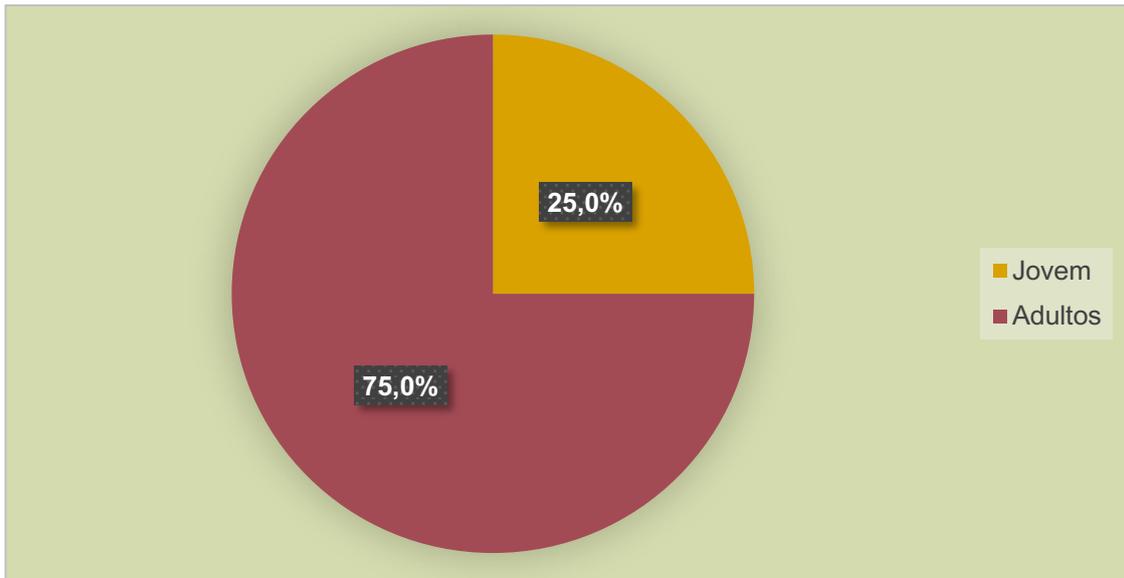


Gráfico 4. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com a idade.

No que diz respeito à raça, os animais foram incluídos em duas categorias: pura e cruzada, sendo que 4,2% (2/48) eram de raça pura e 95,8% (46/48) de raça cruzada (Gráfico 5).

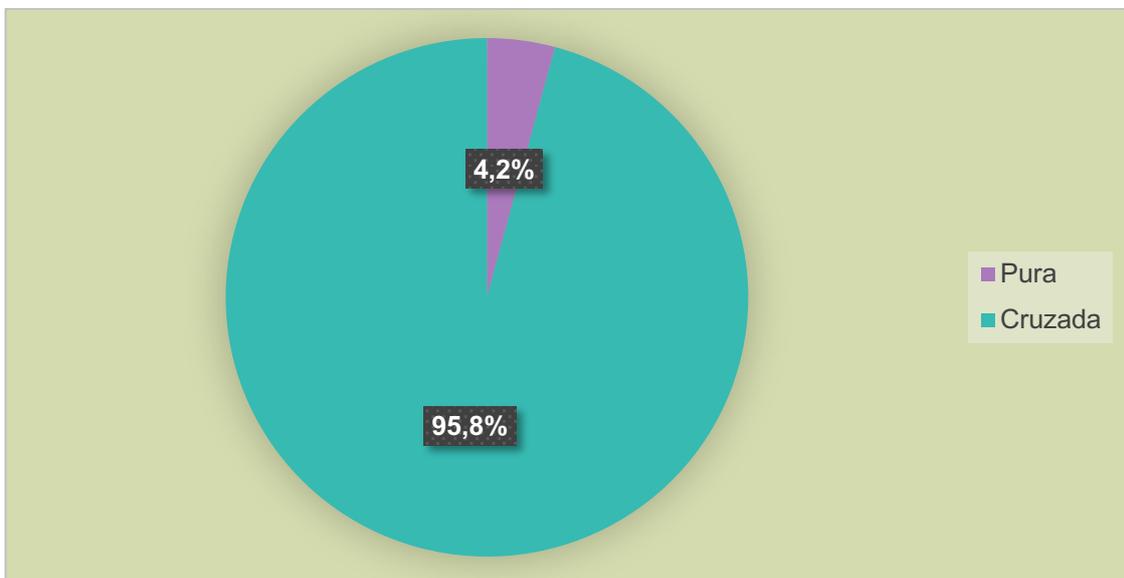


Gráfico 5. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com a raça.

Dos 48 bovinos testados, 62,5% (30/48) pertenciam à zona norte, 8,3% (4/48) eram provenientes da zona centro e, 29,2% (14/48) da zona sul (Gráfico 6).

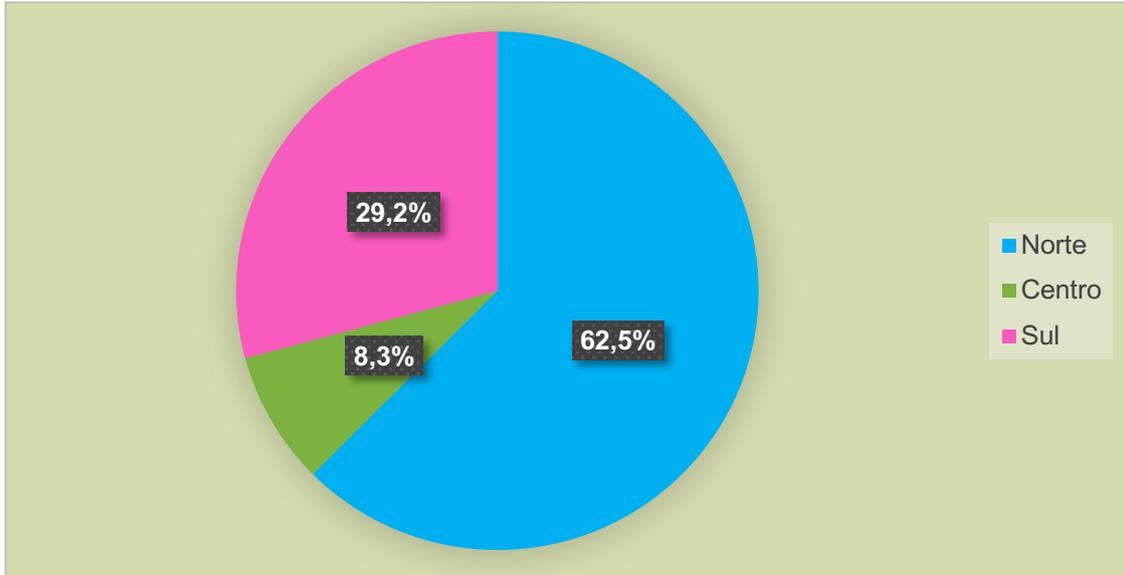


Gráfico 6. Distribuição dos bovinos em estudo de acordo com a área geográfica.

4.1.2. Distribuição dos ovinos incluídos no estudo

Verificou-se que 28,3% (98/346) das amostras recolhidas eram de ovinos, das quais 75,5%(74/98) pertenciam a animais do género feminino e 24,5% (24/98) do género masculino (Gráfico 7).

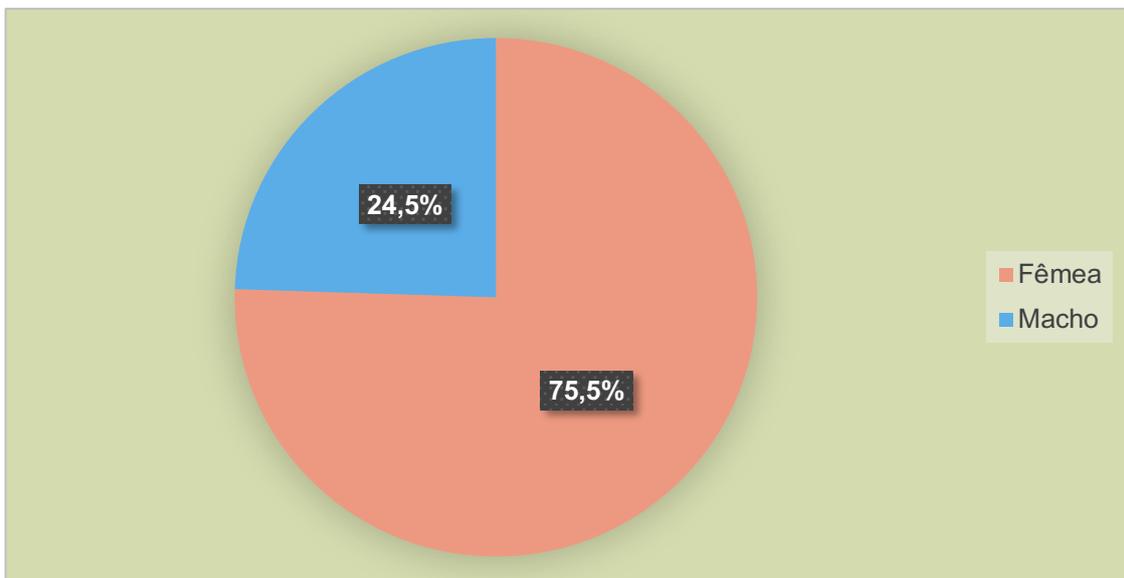


Gráfico 7. Distribuição dos ovinos em estudo de acordo com o género.

Adicionalmente, as fêmeas foram distribuídas com base no seu estado reprodutivo: com procriação prévia (CPP) e sem procriação prévia (SPP), sendo que 58,1% (43/74) das

fêmeas nunca tinham procriado previamente à recolha de sangue, e 41,9% (31/74) já o tinham feito pelo menos uma vez (Gráfico 8).

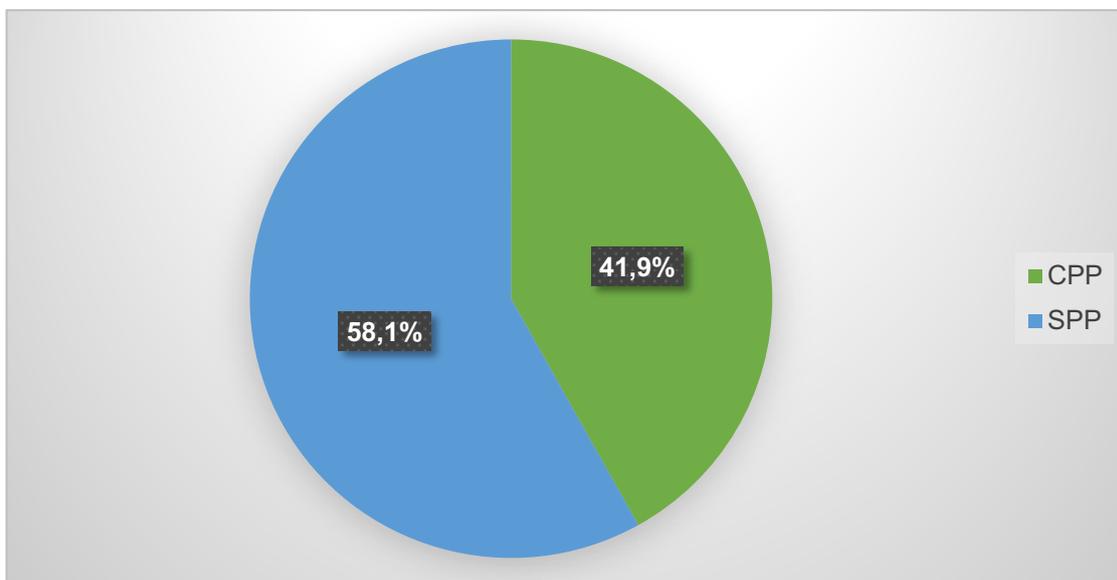


Gráfico 8. Distribuição dos ovinos acordo com o estado reprodutivo das fêmeas.

No que diz respeito à idade, os animais foram agrupados em jovem e adulto, tendo como base a fase reprodutiva. Assim, dos ovinos testados 19,4% (19/98) eram jovens e 80,6% (79/98) eram adultos, verificando-se que a maioria dos animais era adulto (Gráfico 9).

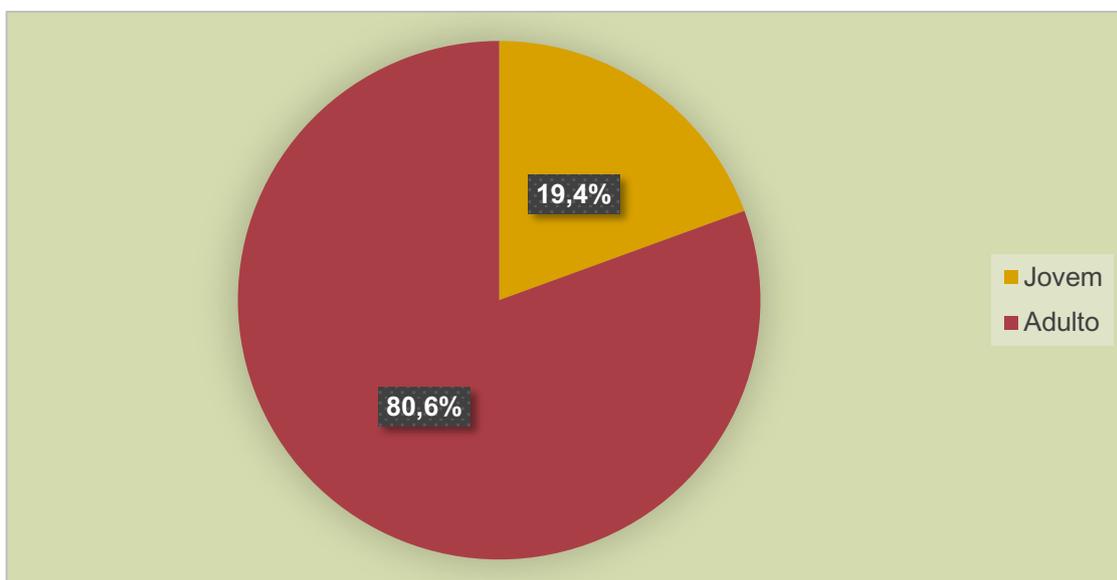


Gráfico 9. Distribuição dos ovinos em estudo de acordo com a idade.

Dos 98 ovinos testados, 53,1% (52/98) pertenciam à zona norte; 33,7% (33/98) à zona centro e; 13,3% (13/98) à zona sul (Gráfico 10).

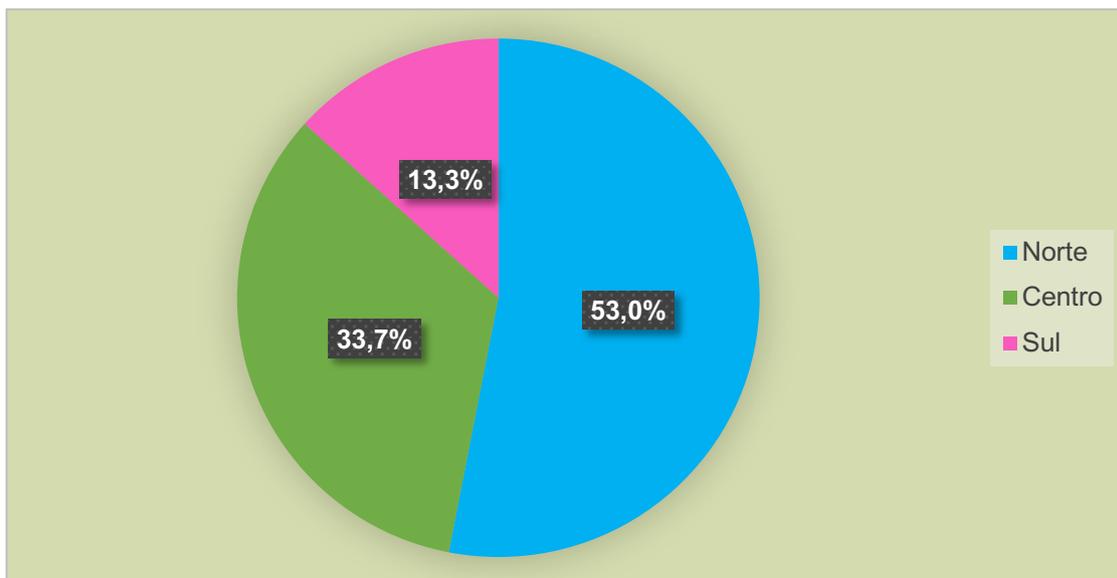


Gráfico 10. Distribuição dos ovinos em estudo de acordo com a área geográfica.

4.1.3. Distribuição dos caprinos incluídos no estudo

Verificou-se que 28% (97/346) das amostras recolhidas eram de caprinos, das quais 69,1% (67/97) eram do género feminino e 30,9% (30/97) do género masculino (Gráfico 11).

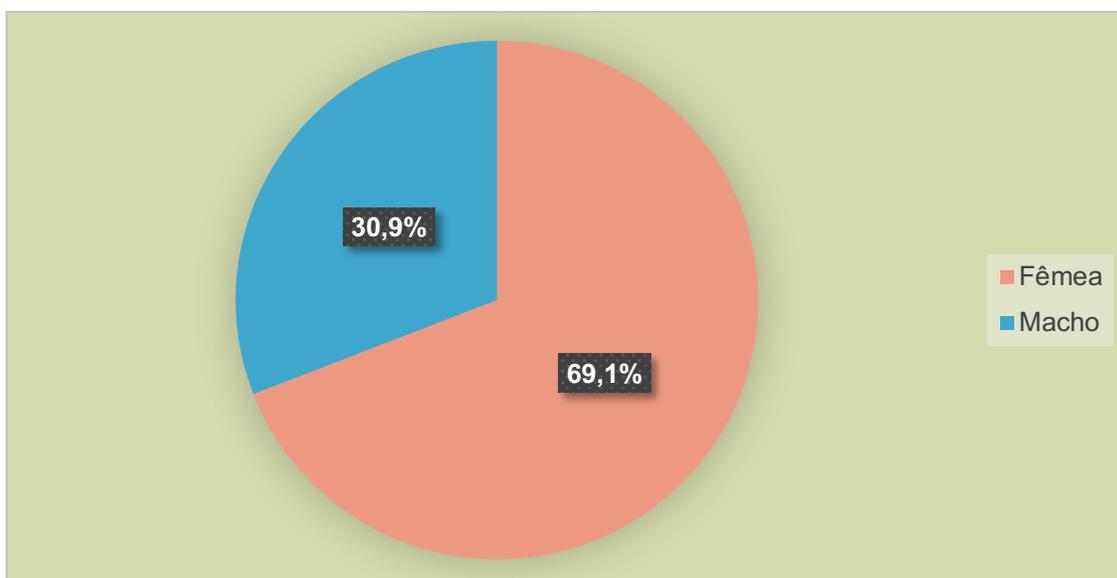


Gráfico 11. Distribuição dos caprinos em estudo de acordo com o género.

Adicionalmente, as fêmeas foram distribuídas, com base no seu estado reprodutivo nas categorias com procriação prévia (CPP) e sem procriação prévia (SPP), sendo que 73,1% (49/67) nunca tinham procriado e 26,9% (18/67) apresentaram um ou mais episódios de procriação.

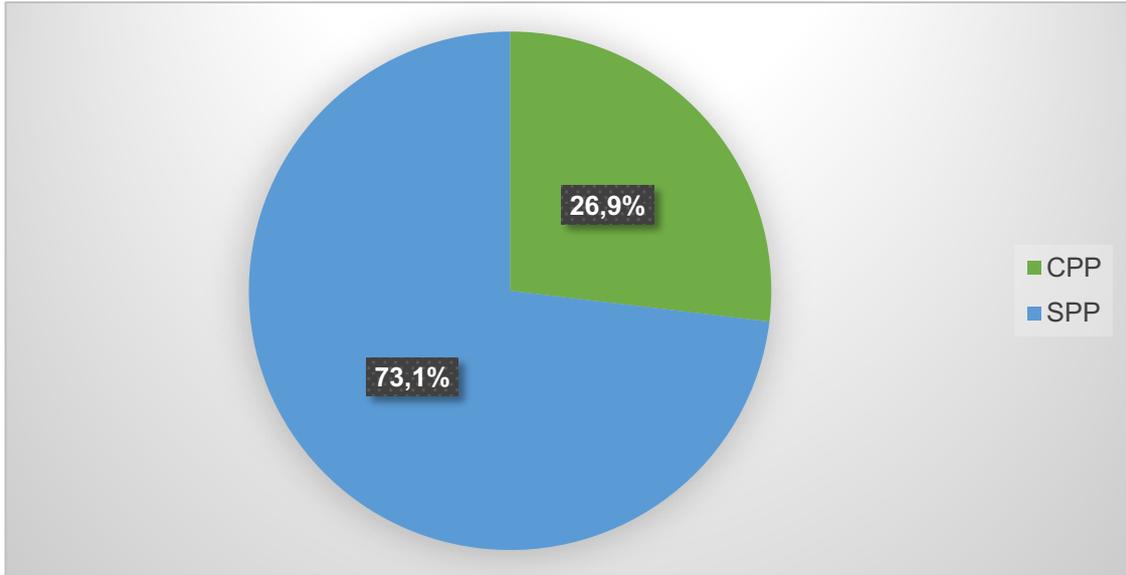


Gráfico 12. Distribuição dos caprinos de acordo com o estado reprodutivo das fêmeas.

Segundo a idade, os animais foram agrupados em jovem e adulto, tendo como base a fase reprodutiva. Assim, dos caprinos testados 23,7% (23/97) eram jovens e 76,3% (74/97) eram adultos, verificando-se que a maioria dos animais era adulto (Gráfico 13).

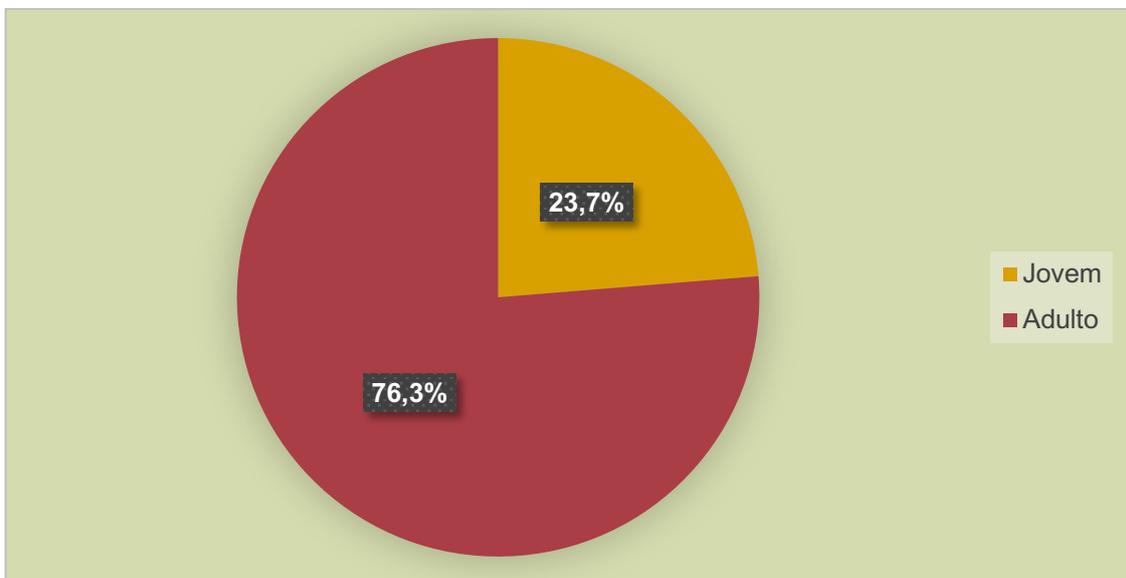


Gráfico 13. Distribuição dos caprinos em estudo de acordo com a idade.

Dos 97 caprinos testados, 44,3% (43/97) pertenciam à zona norte; 27,8% (27/97) à zona centro e 27,8% (27/97) à zona sul (Gráfico 14).

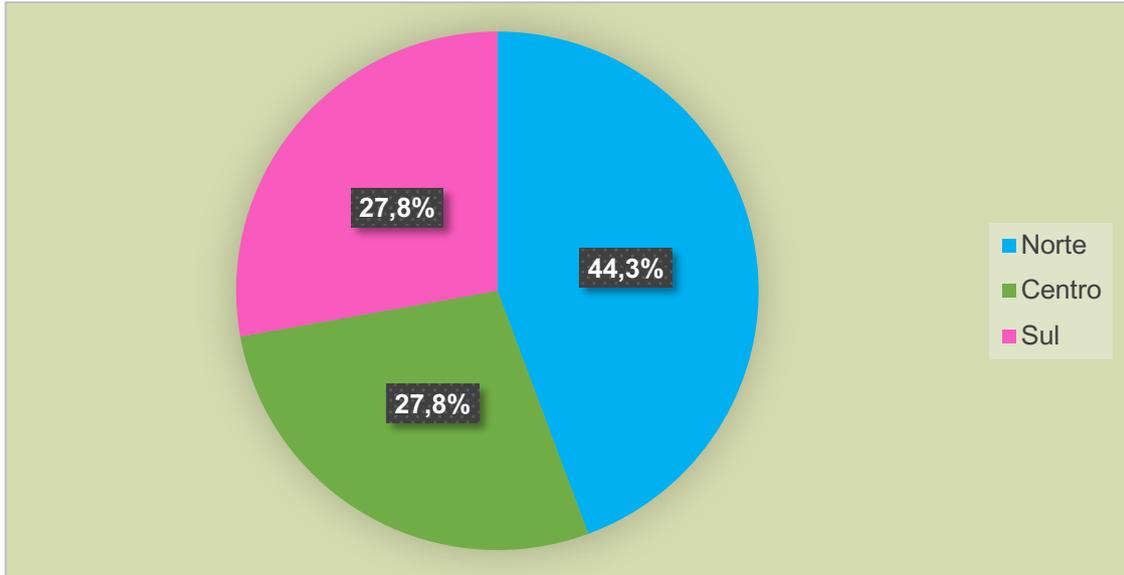


Gráfico 14. Distribuição dos caprinos em estudo de acordo com a área geográfica.

*Devido a arredondamentos a uma casa decimal somatório dá 99,9%, e não 100%.

4.1.4. Distribuição dos suínos incluídos no estudo

Verificou-se que 29,8% (103/346) das amostras recolhidas eram suínos, das quais 48,5% (50/103) eram do género feminino e 51,5% (53/103) do género masculino (Gráfico 15).

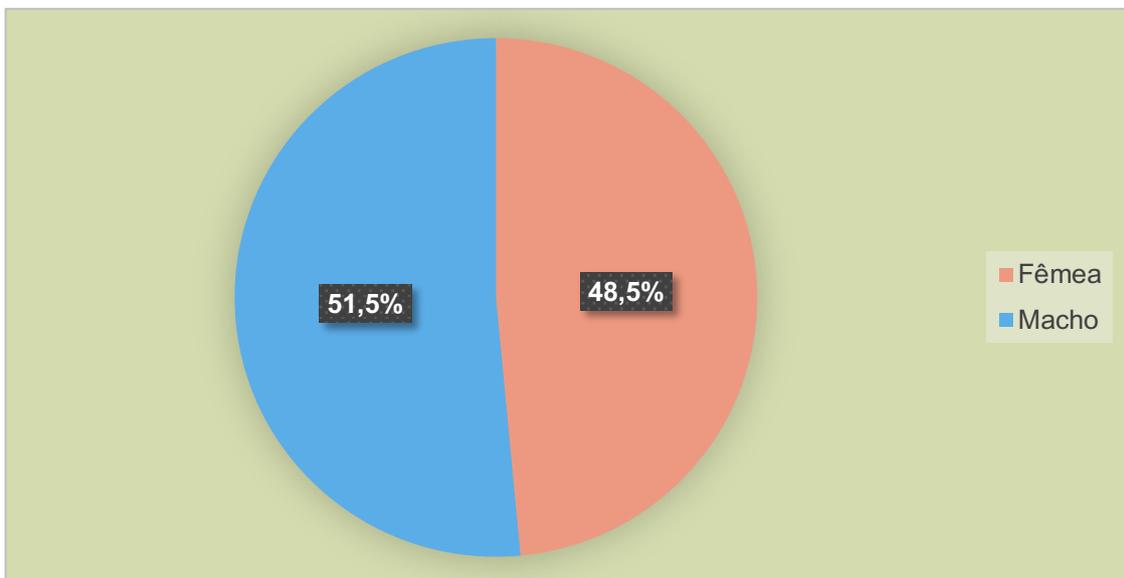


Gráfico 15. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com o género.

Foi, ainda possível proceder no caso dos suínos machos a divisão de 41,5% (22/53) castrados e 58,5% (31/53) não castrados, sendo que prevalecia uma maioria não castrada.

Segundo a idade, os animais foram agrupados em jovem e adulto, tendo como base a fase reprodutiva. Assim, dos suínos testados 24,3% (25/103) eram jovens e 75,7% (78/103) eram adultos, verificando-se que a maioria dos animais era adulto (Gráfico 16).

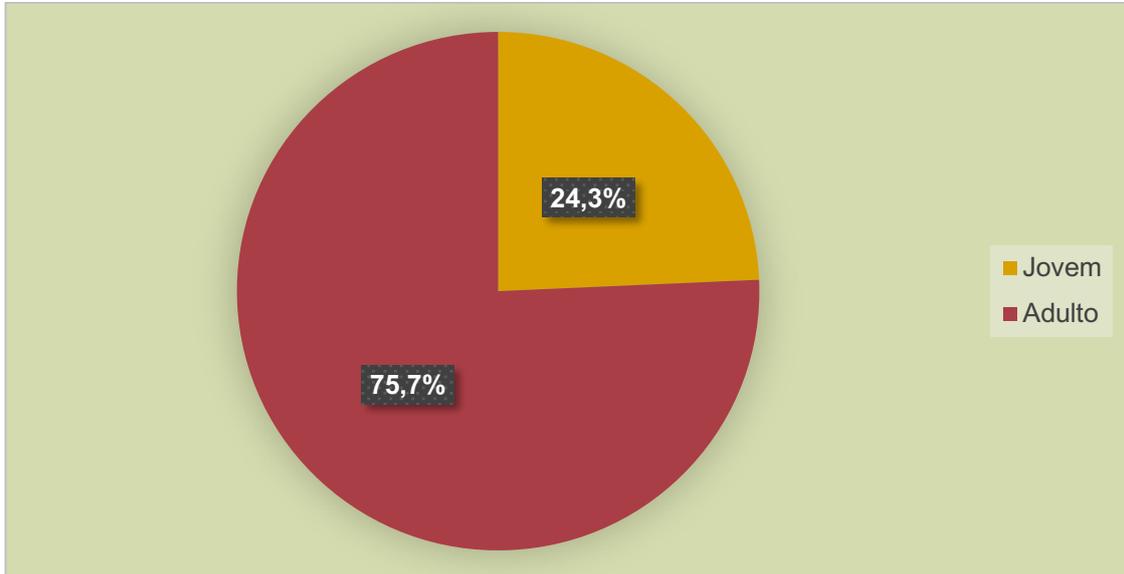


Gráfico 16. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com a idade.

No que diz respeito à raça, os animais foram incluídos em duas categorias: Large White e cruzada, sendo que 12,6% (13/103) eram de raça Large White e 87,4% (90/103) de raça cruzada (Gráfico 17).

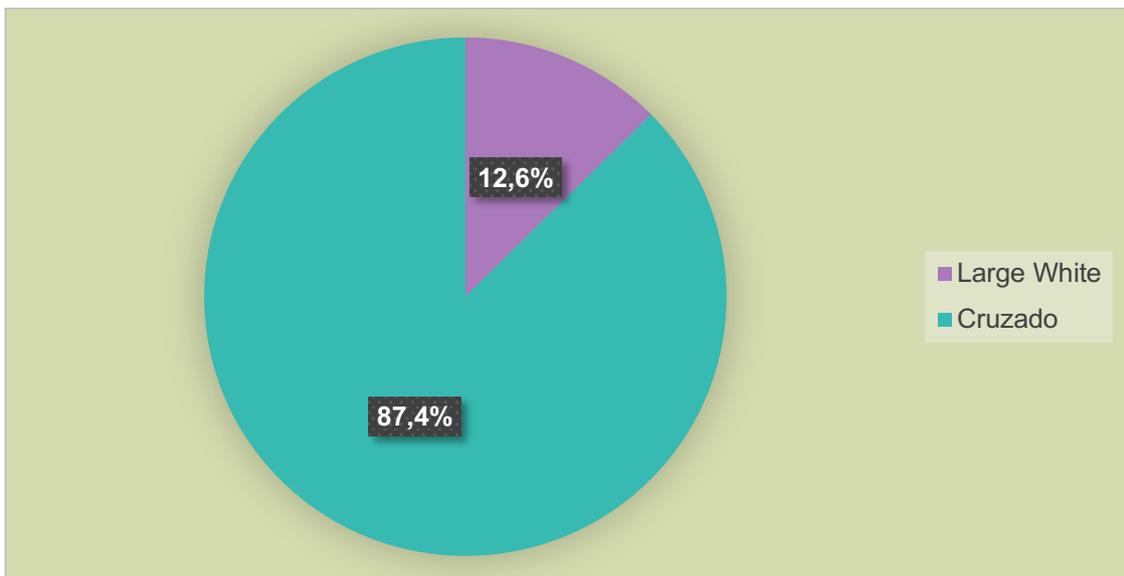


Gráfico 17. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com a raça.

Dos 103 suínos testados, 40,8% (42/103) pertenciam à zona norte, 19,4% (20/103) à zona centro e, 39,8% (41/103) à zona sul (Gráfico 18).

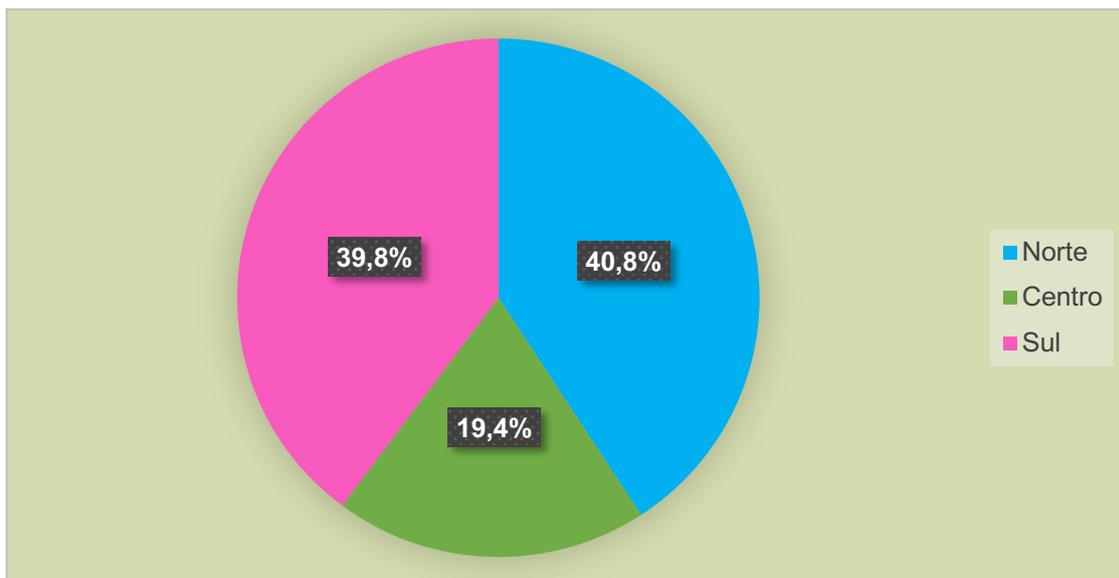


Gráfico 18. Distribuição dos suínos em estudo de acordo com a área geográfica.

4.2. Seroprevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* nos animais incluídos no estudo

De um total de 346 amostras analisadas e de acordo com o “cut-off” estabelecido, 193 foram seropositivas representando uma seroprevalência geral de 55,8%.

Destes 193 animais seropositivos, 6,7% (13/193) eram bovinos, 34,7% (67/193) eram ovinos, 35,2% (68/193) eram caprinos e, 23,3% (45/193) eram suínos (Gráfico 19).

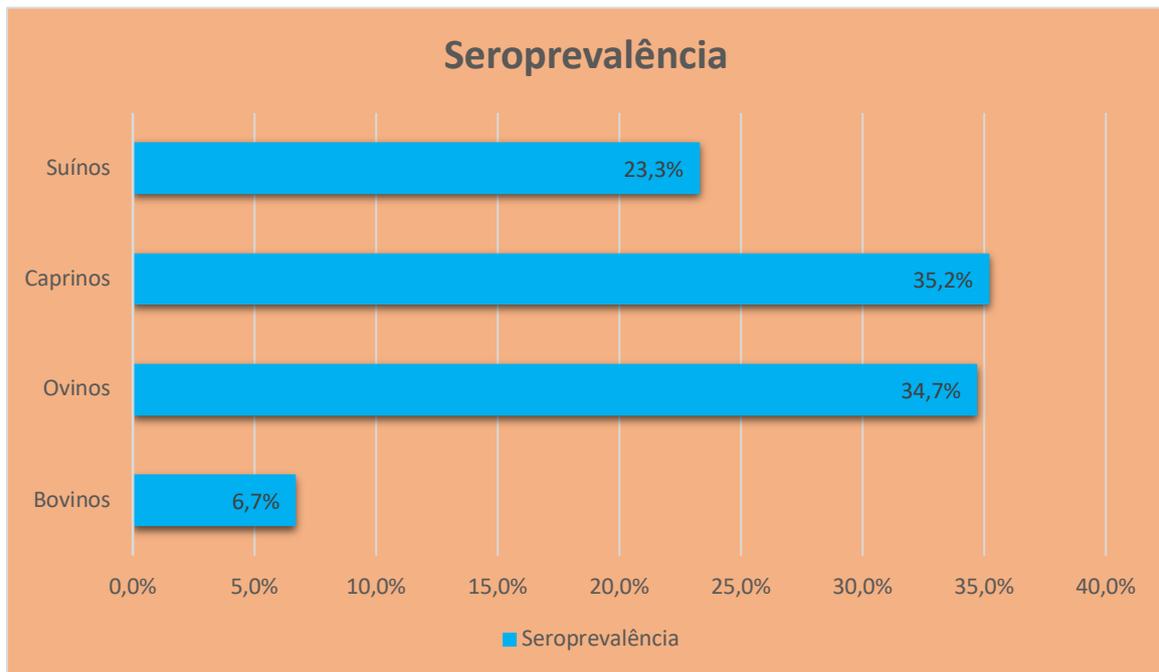


Gráfico 19. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* em bovinos, ovinos, caprinos e suínos de São Tomé.

*Devido a arredondamentos a uma casa decimal somatório dá 99,9%, e não 100%.

Dos 193 soros positivos, 14 possuíam um título de 20, 1 apresentava um título de 100 (bovinos) e 178 animais um título igual ou superior a 400. Assim, 92,2% dos 193 soros positivos apresentaram um título elevado, ou seja, igual ou superior a 400.

Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas na comparação aos pares entre as diferentes espécies, na área geográfica nos bovinos e pequenos ruminantes e, na idade nos caprinos.

4.2.1. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* em bovinos

Dos 48 bovinos testados, 27,1% (13/48) foram seropositivos, dos quais 1 apresentou um título de 100 e 12 animais um título igual ou superior a 400 (Tabela 7).

Das 45 fêmeas, 24,4% (11/45) foram seropositivas (Gráfico 20), das quais uma apresentou num título de 100 e 10 animais um título igual ou superior a 400, sendo que 36,4% das SPP (4/11) foram seropositivas para um título igual ou superior a 400.

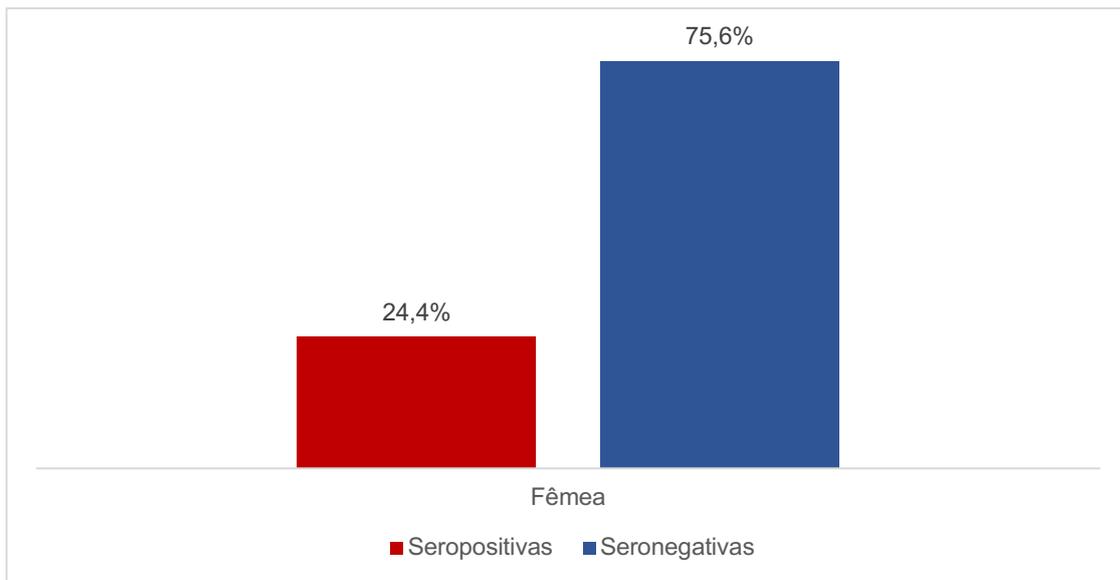


Gráfico 20. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos bovinos fêmeas

Das 14 fêmeas gestantes e CPP, 7,1% (1/14) foram seropositivas para um título de 100 e 21,4% (3/14) para um título igual ou superior a 400. As fêmeas sem estado reprodutivo definido não foram contabilizadas para esta análise estatística.

Dos três machos incluídos no estudo, 66,7% (2/3) foram seropositivos para um título igual ou superior a 400 (Gráfico 21).

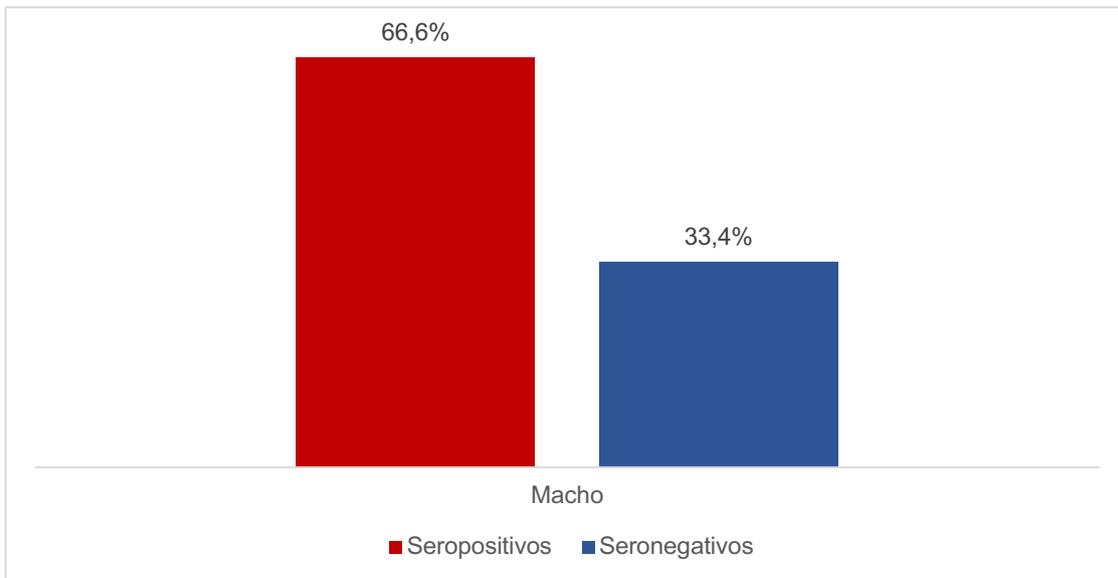


Gráfico 21. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos bovinos machos.

Em relação à variável idade, 41,7% (5/12) dos bovinos jovens com um título igual ou superior a 400 (Gráfico 22) e, 22,2% (8/36) dos adultos foram seropositivos, sendo que 2,8% (1/36) apresentaram um título de 100 e 19,4% (7/36) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 23).

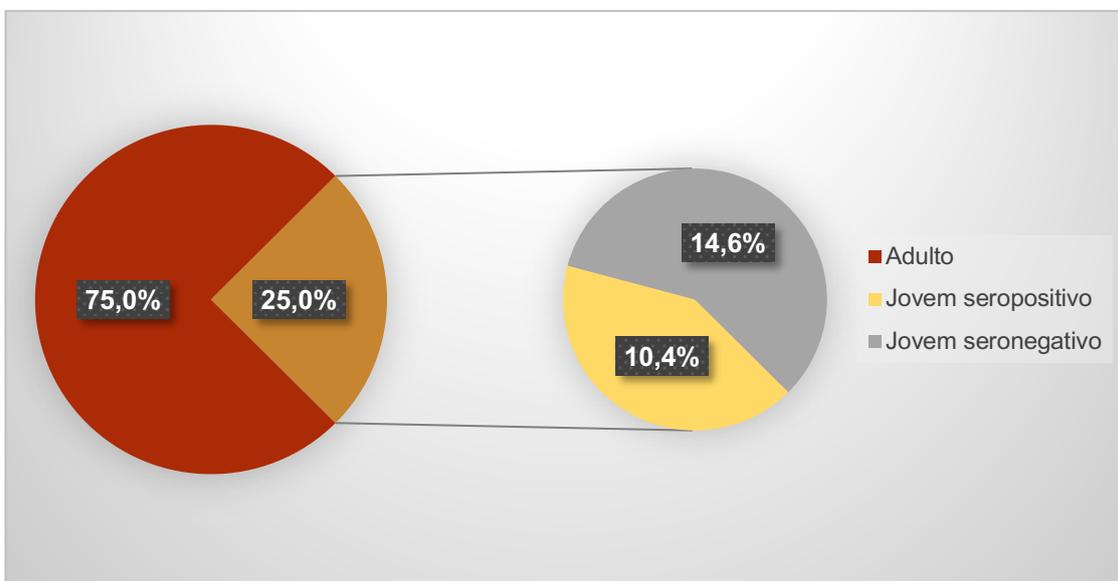


Gráfico 22. Distribuição dos bovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em jovens.

Laranja-acastanhado: percentagem de jovens no estudo.

Amarelo: percentagem de jovens seropositivos a *T. gondii*, no universo dos bovinos testados.

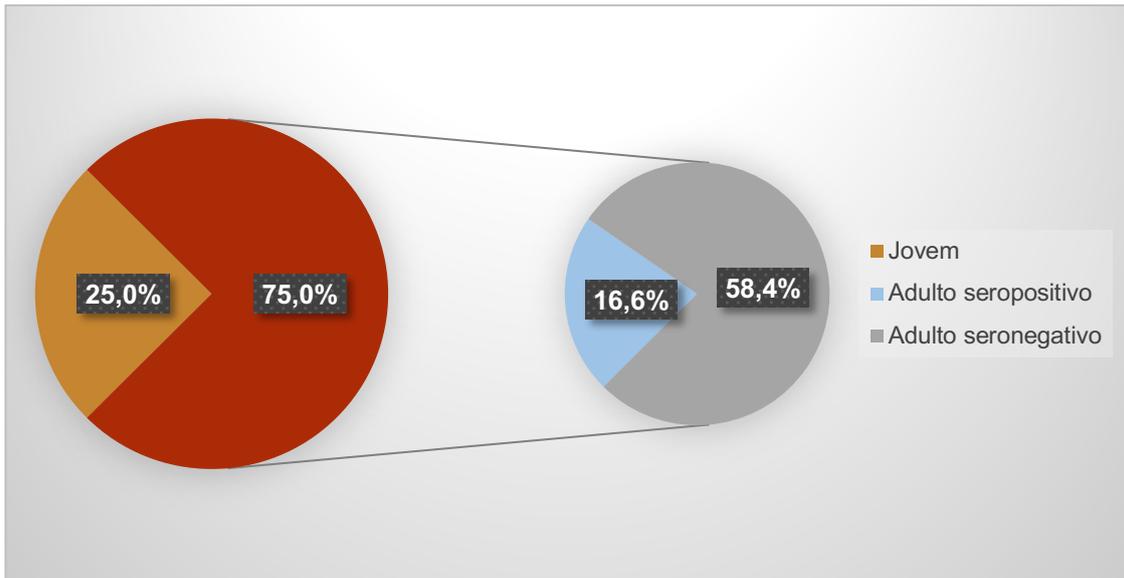


Gráfico 23. Distribuição dos bovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em adultos.

Vermelho-tijolo: percentagem de adultos no estudo.

Azul: percentagem de adultos seropositivos a *T. gondii*, no universo dos bovinos testados.

No que diz respeito à raça, todos os bovinos de raça pura 4,2% (2/48) foram seronegativos. Dos 95,8% (46/48) bovinos raça cruzada, 2,2% (1/46) seropositivo apresentava um título de 100 e 26,1% (12/46) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 24).

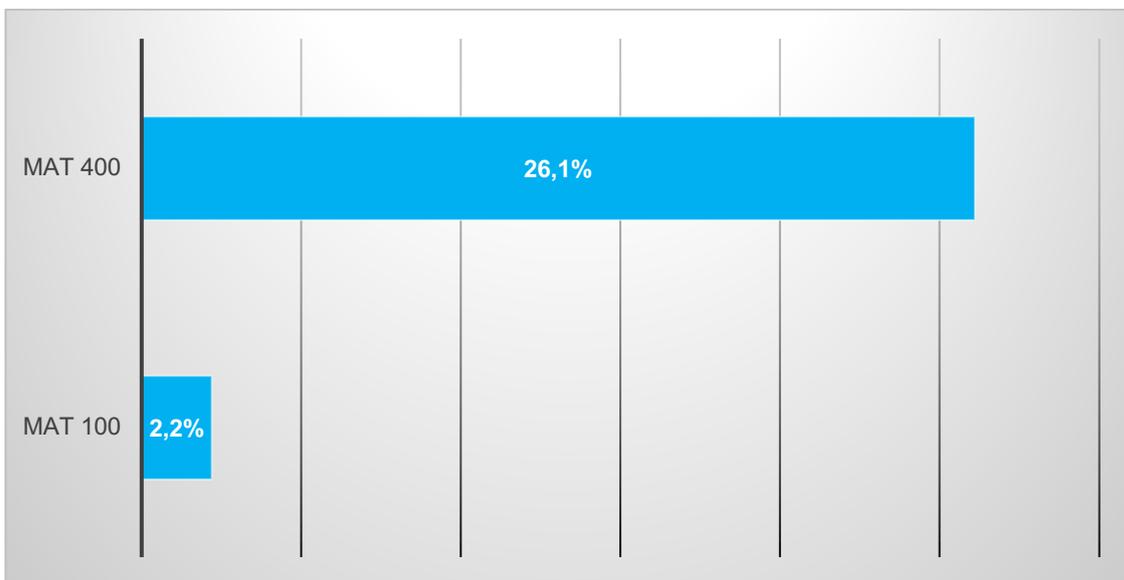


Gráfico 24. Seroprevalência por título (MAT 100 e MAT 400), em bovinos de raça cruzada.

Em relação à localização geográfica, na zona norte 10% (3/30) foram seropositivos, sendo que 3,3% (1/30) apresentava título de 100 e 6,7% (2/30) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 25).

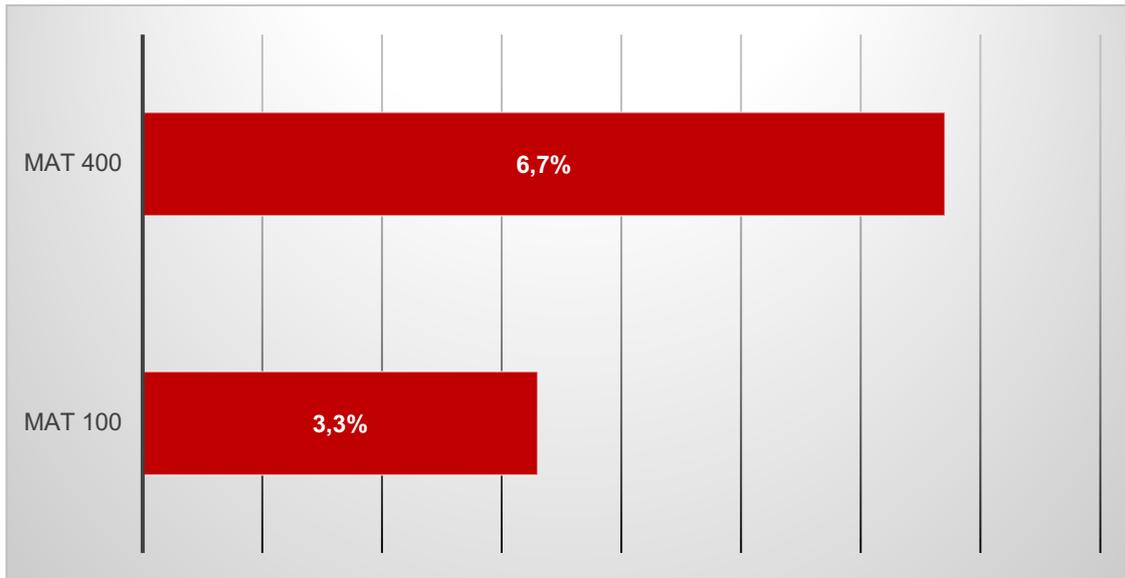


Gráfico 25. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* em bovinos da zona norte de acordo com o título (MAT 100 e MAT 400).

Na zona centro não se verificou a existência de animais seropositivos para *T. gondii*. Por outro lado, na zona sul, 71,4% (10/14) dos bovinos foram seropositivos com um título igual ou superior a 400 (Gráfico 26). Foi observada uma seroprevalência significativamente mais elevada ($p < 0,001$) em bovinos provenientes da zona sul, quando comparados com os bovinos da zona norte.

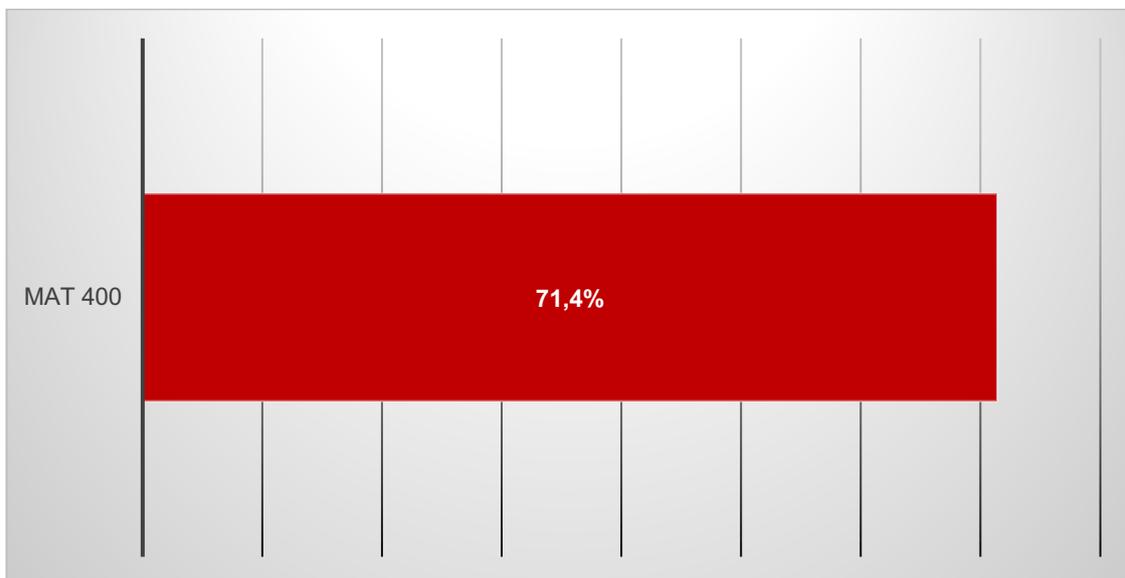


Gráfico 26. Seroprevalência por título em bovinos na zona sul.

A Tabela 7 apresenta os valores de seroprevalência de infecção por *T. gondii* em bovinos de São Tomé de acordo com as variáveis independentes, e respectivos títulos.

Tabela 7. Seroprevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* em bovinos de São Tomé de acordo com género, idade, raça e área geográfica.

Variável/categoria	Título MAT 100*	IC (%)	Título MAT 400	IC (%)
	% positivos (n)		% positivos (n)	
Género				
Feminino	24,4 (11)	12,9 – 39,5	22,2 (10)	11,2 – 37,1
Masculino	66,7 (2)	9,4 – 99,2	66,7 (2)	9,4 – 99,2
Idade				
Jovem	41,7 (5)	15,2 – 72,3	41,7 (5)	15,2 – 72,3
Adulto	22,2 (8)	10,1 – 39,1	19,4 (7)	8,2 – 36,0
Raça				
Pura	0,0 (0)	0,0 – 84,2	0,0 (0)	0,0 – 84,2
Cruzada	28,3 (13)	16,0 – 43,5	26,1 (12)	14,3 – 41,1
Área geográfica				
Norte	10,0 (3) ^a	2,1 – 26,5	6,7 (2) ^b	0,8 – 22,1
Centro	0,0 (0)	0,0 – 60,2	0,0 (0)	0,0 – 60,2
Sul	71,4 (10) ^a	41,9 – 91,6	71,4 (10) ^b	41,9 – 91,6
Total	27,1 (13)	15,3 – 41,8	25,0 (12)	13,6 – 39,6

*Limiar de positividade (“cut-off”); IC: intervalo de confiança de 95%; ^{a,b} $p < 0,001$.

4.2.2. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* em ovinos

Dos 98 ovinos testados, 68,4% (67/98) foram seropositivos, dos quais 3 apresentaram um título de 20 e 64 animais um título igual ou superior a 400 (Tabela 8).

Das 74 fêmeas, 79,7% (59/74) eram seropositivas (Gráfico 27), das quais 4,1% (3/74) apresentaram um título de 20 e 75,7% (56/74) um título igual ou superior a 400.

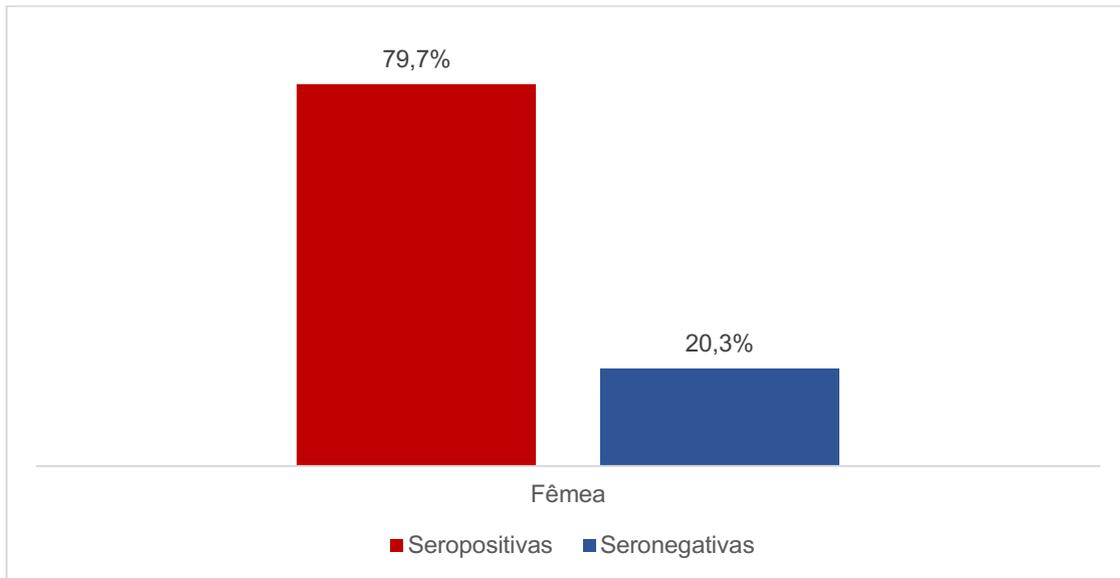


Gráfico 27. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos ovinos fêmeas

Com base no seu estado reprodutivo, 4,7% (2/43) das fêmeas SPP foram seropositivas com um título de 20, e 67,4% (29/43) um título igual ou superior a 400; 3,2% (1/31) das fêmeas CPP foram seropositivas com um título de 20 e 87,1% (27/31) apresentaram um título igual ou superior a 400.

Dos 24 machos testados, 33,3% (8/24) foram seropositivos com um título igual ou superior a 400 (Gráfico 28).

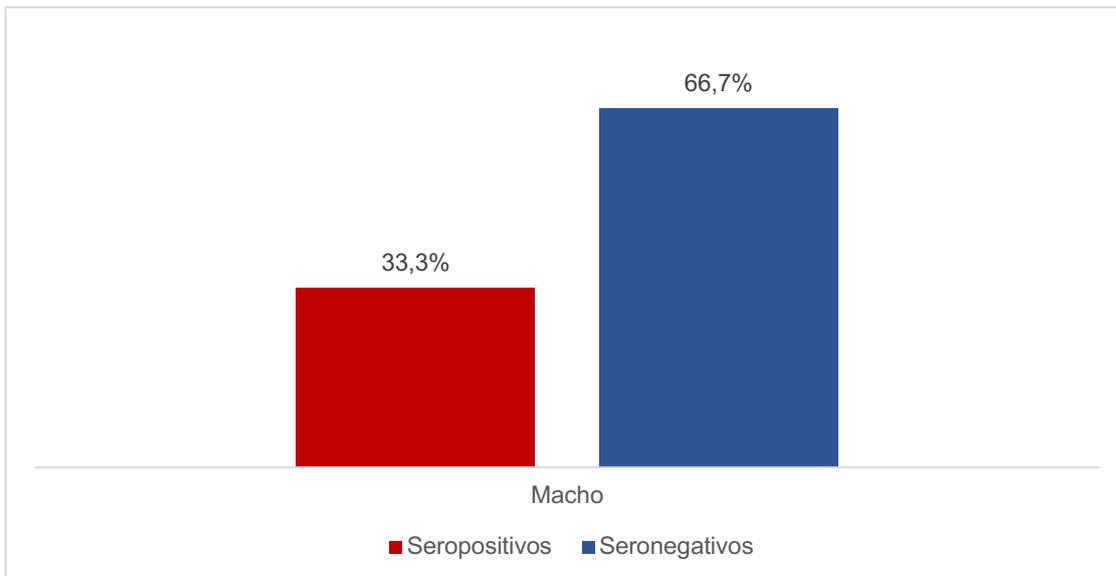


Gráfico 28. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos ovinos machos.

Dos 19 ovinos jovens, 10,5% (2/19) foram seropositivos com um título de 20 e 26,3% (5/19) apresentaram um título igual ou superior a 400 (Gráfico 29); dos 79 ovinos adultos 75,9% (60/79) foram seropositivos, sendo que 1,2% (1/79) apresentaram um título de 20 e 74,7% (59/79) possuíam um título igual ou superior a 400 (Gráfico 30).

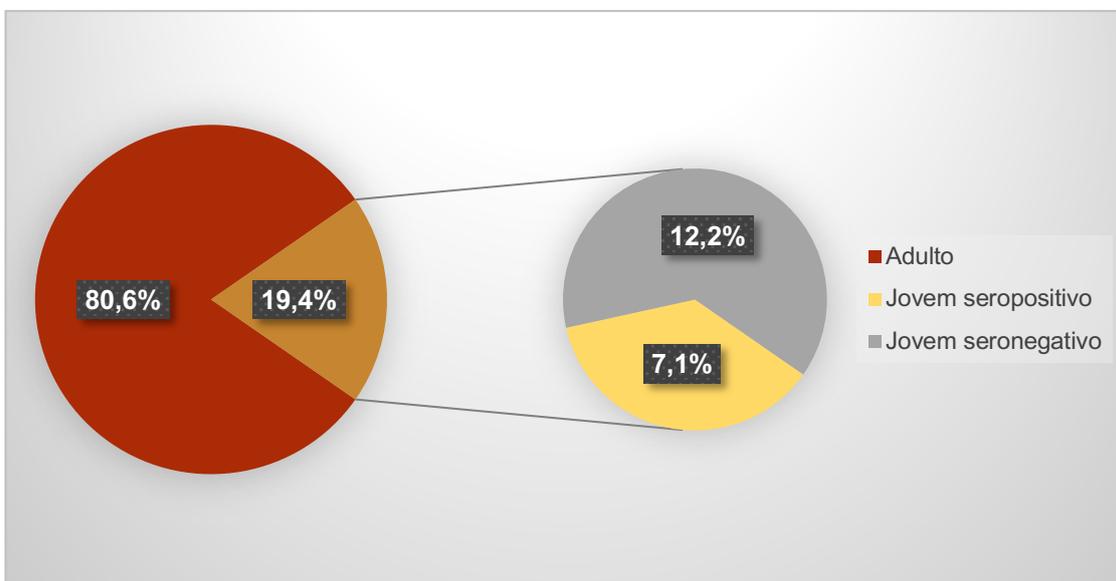


Gráfico 29. Distribuição dos ovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em jovens.

Laranja-acastanhado: percentagem de jovens no estudo.

Amarelo: percentagem de jovens seropositivos a *T. gondii*, no universo dos ovinos testados.

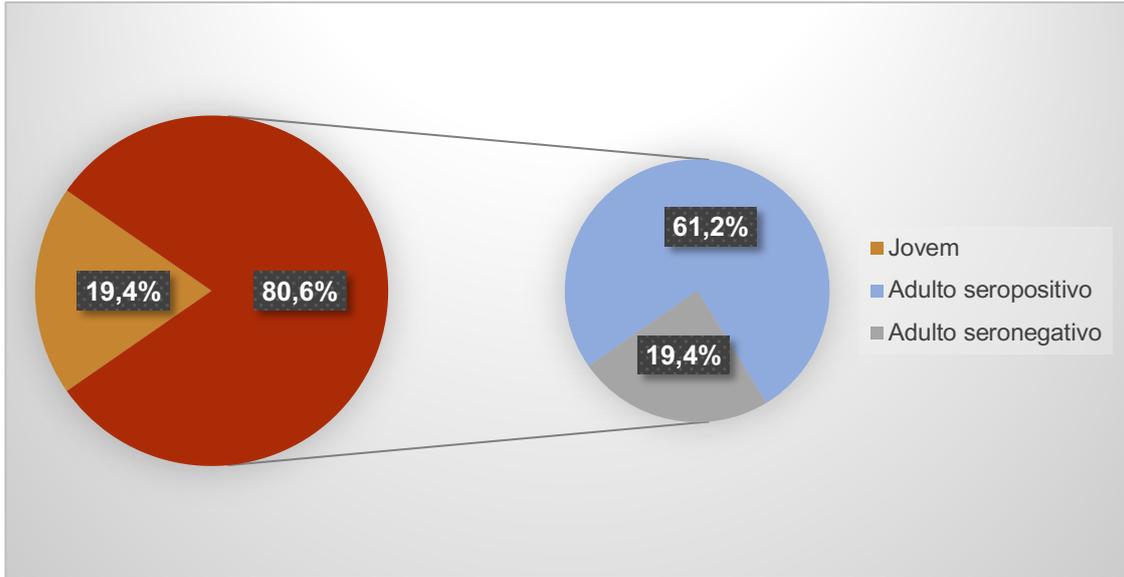


Gráfico 30. Distribuição dos ovinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em adultos.

Vermelho-tijolo: percentagem de adultos no estudo.

Azul: percentagem de adultos seropositivos a *T. gondii*, no universo dos ovinos testados.

Em relação à localização geográfica, na zona norte, 57,7% (30/52) dos ovinos foram seropositivos, dos quais 1,9% (1/52) apresentaram um título 20 e 55,8% (29/52) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 31).

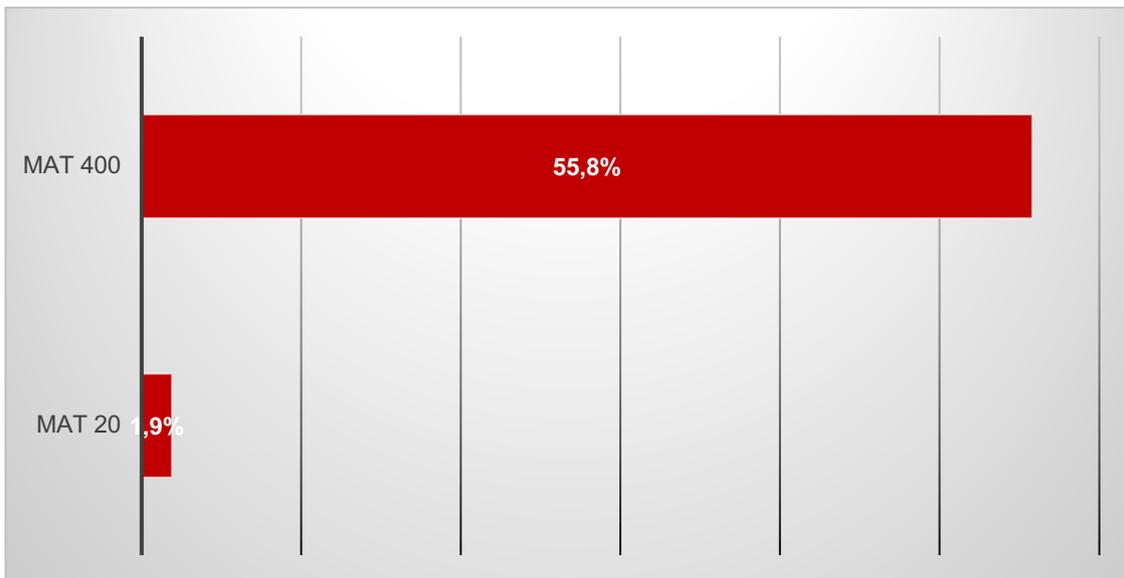


Gráfico 31. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em ovinos, na zona norte.

Na zona centro 93,9 % (31/33) dos ovinos foram seropositivos, dos quais 3,0% (1/33) possuíam um título de 20 e 90,9% (30/33) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 23).

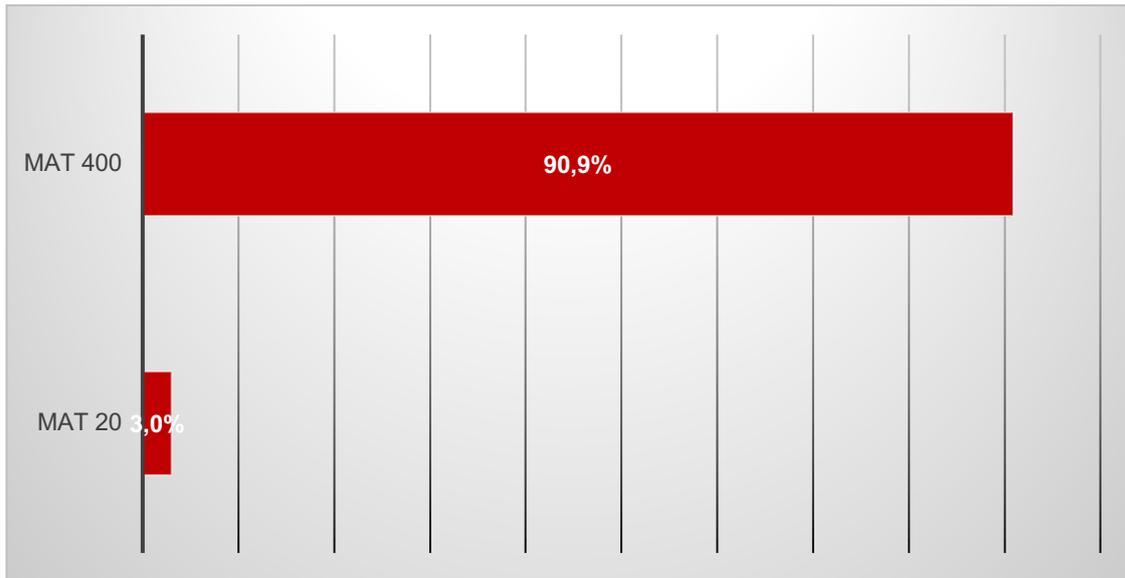


Gráfico 32. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em ovinos, na zona centro.

Na zona sul 46,2% (6/13) dos animais foram seropositivos, 7,7% (1/13) com um título de 20 e 38,5% (5/13) com um título igual ou superior a 400 (Gráfico 33).

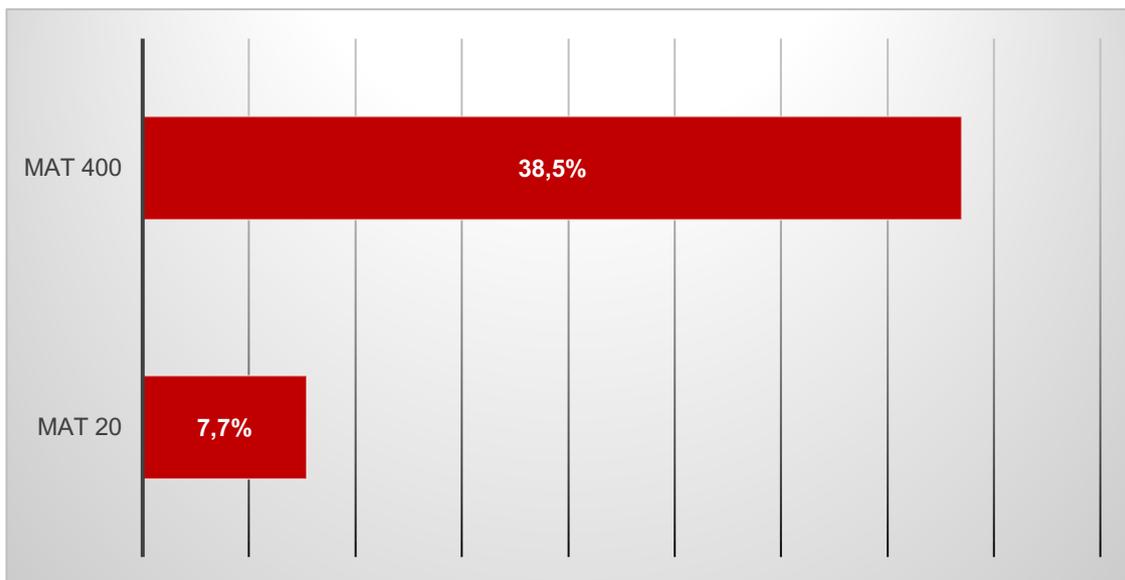


Gráfico 33. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em ovinos, na zona sul.

A Tabela 8 apresenta os valores de seroprevalência de infecção por *T. gondii* em ovinos de São Tomé de acordo com as variáveis independentes, e respetivos títulos; sendo possível identificar como possível fator de risco a área geográfica ($p < 0,001$).

Tabela 8. Seroprevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de São Tomé de acordo com género, idade e área geográfica.

Variável/categoria	Título MAT 20*	IC (%)	Título MAT 400	IC (%)
	% positivos (n)		% positivos (n)	
Género				
Feminino	79,7 (59)	68,8 – 88,2	75,7 (56)	64,3 – 84,9
Masculino	33,3 (8)	15,6 – 55,3	33,3 (8)	15,6 – 55,3
Idade				
Jovem	36,8 (7)	16,3 – 61,6	26,3 (5)	9,1 – 51,2
Adulto	75,9 (60)	65,0 – 84,9	74,7 (59)	63,6 – 83,8
Área geográfica				
Norte	57,7 (30) ^a	43,2 – 71,3	55,8 (29) ^c	41,3 – 69,5
Centro	93,9 (31) ^{a,b}	79,8 – 99,3	90,9 (30) ^{c,d}	75,7 – 98,1
Sul	46,2 (6) ^b	19,2 – 74,9	38,5 (5) ^d	13,9 – 68,4
Total	68,4 (67)	58,2 – 77,40	65,3 (64)	55,0 – 74,6

*limiar de positividade (“cut-off”); IC: intervalo de confiança de 95%;
 MAT: “modified agglutination test” ^{a,b,c,d}p = 0,003.

4.2.3. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* em caprinos

Dos 97 caprinos testados, 70,1% (68/97) foram seropositivos, dos quais 3 apresentaram um título de 20 e 65 animais um título igual ou superior a 400 (Tabela 9).

Das 67 fêmeas 76,1% (51/67) foram seropositivas, das quais 3,0% (2/67) apresentaram um título de 20 e 73,1% (49/67) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 34).

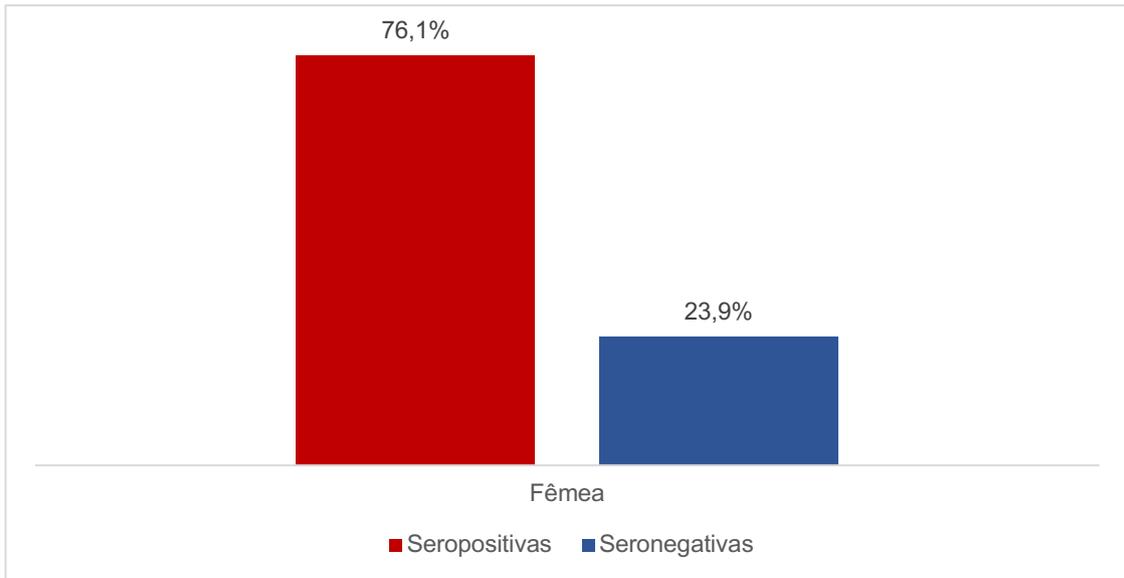


Gráfico 34. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos caprinos fêmeas

Com base no seu estado reprodutivo, 2,0% (1/49) das fêmeas SPP foram seropositivas com um título de 20, e 69,4% (34/49) um título igual ou superior a 400; 5,6% (1/18) das fêmeas CPP foram seropositivas com um título de 20 e 83,3% (15/18) apresentaram um título igual ou superior a 400.

Dos 30 machos testados, 3,4% (1/30) positivo num título de 20 e 53,3% (16/30) foram seropositivos para um título igual ou superior a 400 (Gráfico 35).

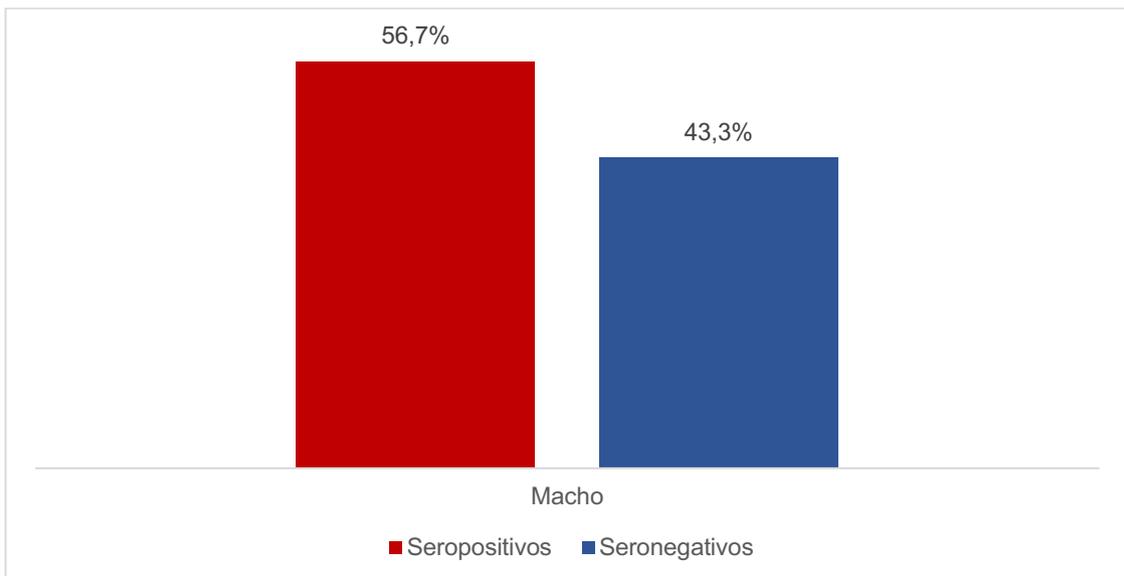


Gráfico 35. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos caprinos machos.

Dos 23 caprinos jovens, 34,8% (8/23) foram seropositivos para um título igual ou superior a 400 (Gráfico 36); dos 74 caprinos adultos 81,1% (60/74) foram seropositivos, sendo

que 4,1% (3/74) apresentaram um título de 20 e 77,0% (57/74) possuíam um título igual ou superior a 400 (Gráfico 37).

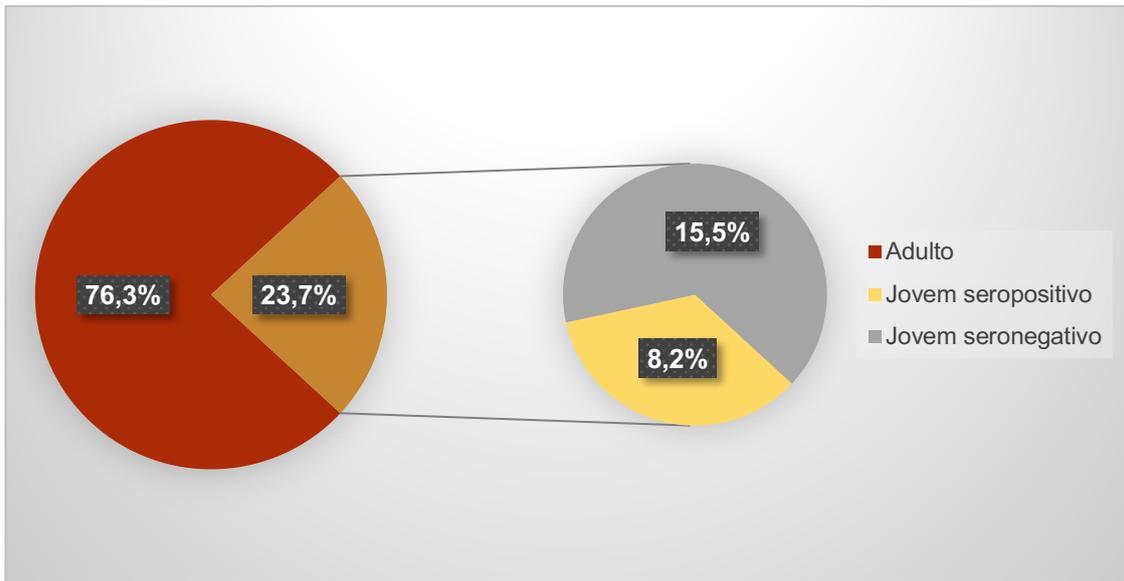


Gráfico 36. Distribuição dos caprinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em jovens.

Laranja-acastanhado: percentagem de jovens no estudo.

Amarelo: percentagem de jovens seropositivos a *T. gondii*, no universo dos caprinos testados.

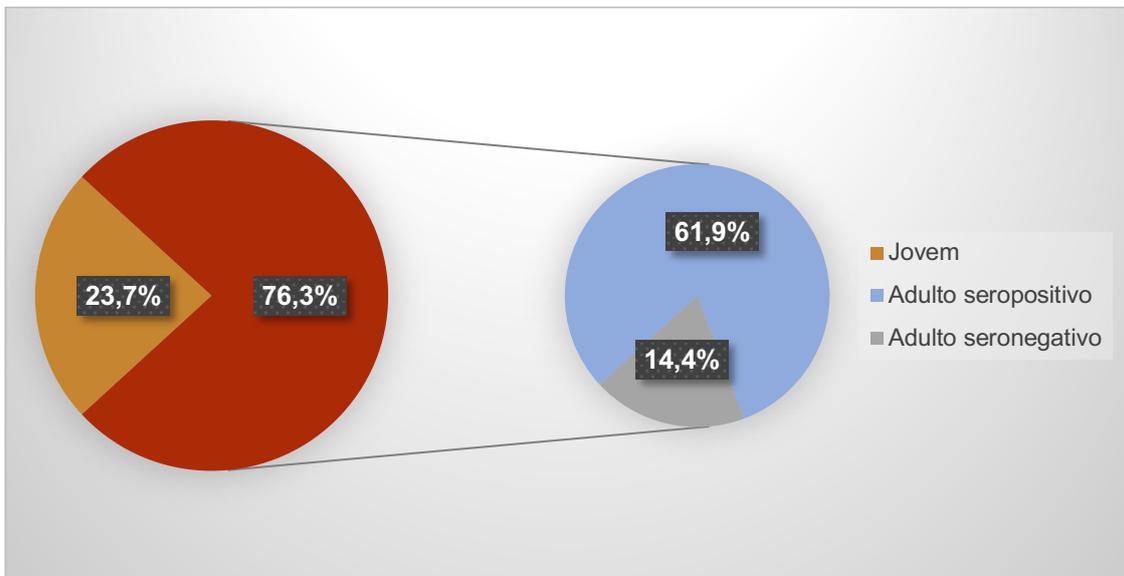


Gráfico 37. Distribuição dos caprinos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em adultos.

Vermelho-tijolo: percentagem de adultos no estudo.

Azul: percentagem de adultos seropositivos a *T. gondii*, no universo dos caprinos testados.

Na zona norte, 55,8% (24/43) dos caprinos foram seropositivos com um título igual ou superior a 400 (Gráfico 38).

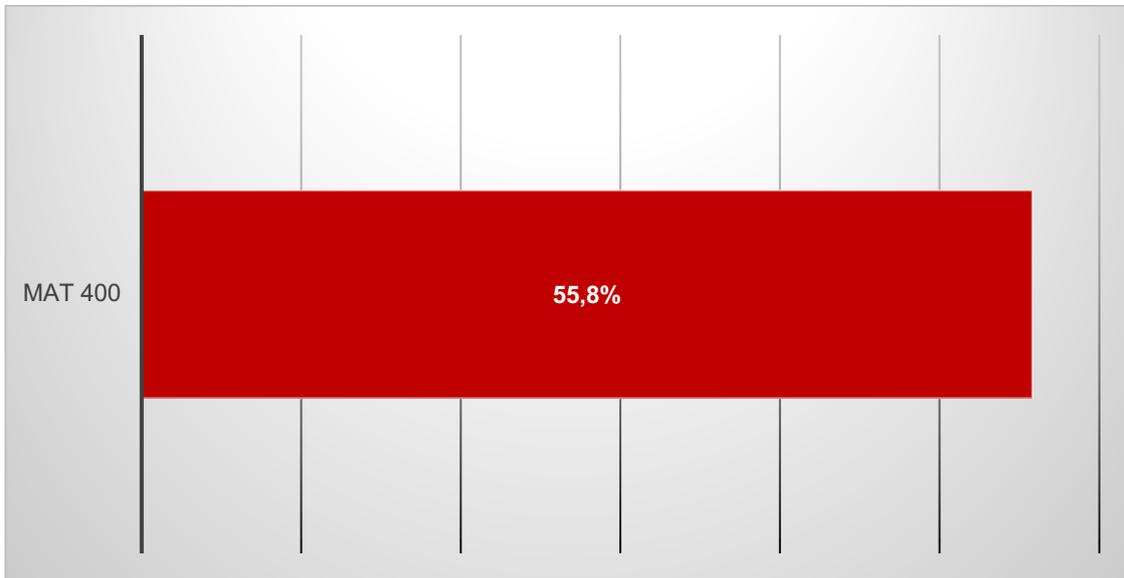


Gráfico 38. Seroprevalência por título (MAT 400) em caprinos, na zona norte.

Na zona centro 88,9%(24/27) dos caprinos foram seropositivos, dos quais 3,7% (1/27) possuía um título de 20 e 85,2% (23/27) num título igual ou superior a 400 (Gráfico 39).

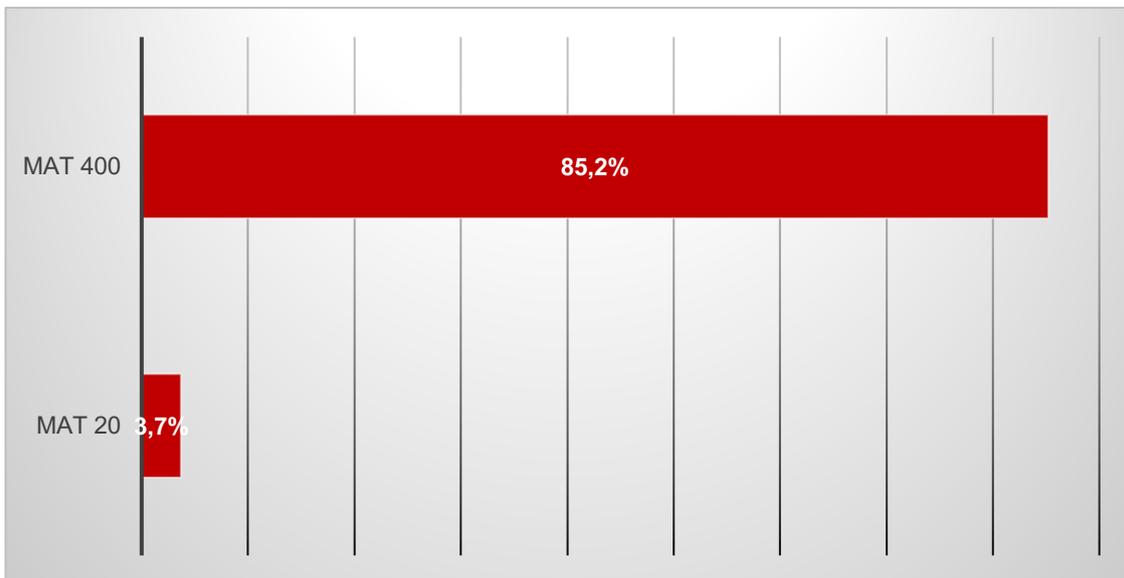


Gráfico 39. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em caprinos, na zona centro.

Na zona sul 74,1% (20/27) dos animais foram seropositivos, 7,4% (2/27) com um título de 20 e 66,7% (18/27) com um título igual ou superior a 400 (Gráfico 40).

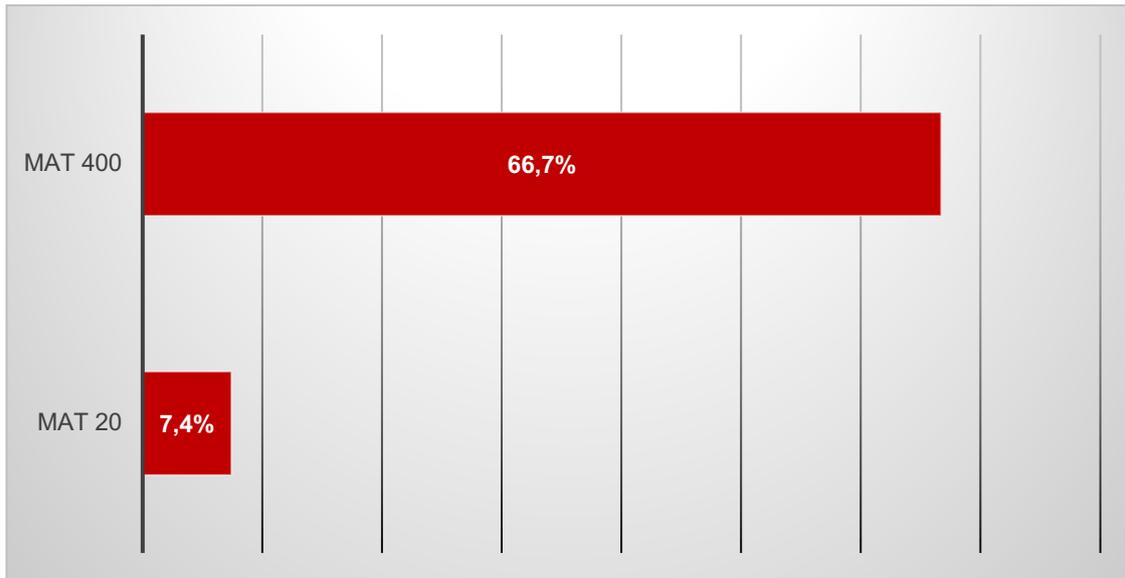


Gráfico 40. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em caprinos, na zona sul.

A Tabela 9 apresenta os valores de seroprevalência de infecção por *T. gondii* em caprinos de São Tomé de acordo com as variáveis independentes, e respetivos títulos; sendo possível identificar como possível fator de risco a idade e área geográfica ($p < 0,001$).

Tabela 9. Seroprevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos de São Tomé de acordo com género, idade e área geográfica.

Variável/categoria	Título MAT 20*	IC (%)	Título MAT 400	IC (%)
	% positivos (n)		% positivos (n)	
Género				
Feminino	76,1 (51)	64,1 – 85,7	73,1 (49)	60,9 – 83,2
Masculino	56,7 (17)	37,4 – 74,5	53,3 (16)	34,3 – 71,7
Idade	$p < 0,001$		$p < 0,001$	
Jovem	34,8 (8)	16,4 – 57,3	34,8 (8)	16,4 – 57,3
Adulto	81,1 (60)	70,3 – 89,2	77,0 (57)	65,8 – 86,0
Área geográfica	$p < 0,011$		$p < 0,039$	
Norte	55,8 (24) ^a	39,9 – 70,9	55,8 (24)	39,9 – 70,9
Centro	88,9 (24) ^a	70,8 – 97,6	85,2 (23)	66,3 – 95,8
Sul	74,1 (20)	53,7 – 88,9	66,7 (18)	46,0 – 83,5
Total	70,1 (68)	60,0 – 79,0	67,0 (65)	56,7 – 76,2

*limiar de positividade (“cut-off”); IC: intervalo de confiança de 95%.

MAT: “modified agglutination test” ^a $p = 0,024$.

4.2.4. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* em suínos

Dos 103 suínos testados, 43,7% (45/103) foram seropositivos, dos quais 8 apresentaram um título de 20 e 37 animais um título igual ou superior a 400 (Tabela 10).

Das 50 fêmeas estudadas 42,0% (21/50) foram seropositivas (Gráfico 41), das quais 10,0% (5/50) apresentaram um título de 20 e 32,0% (16/50) um título igual ou superior a 400.

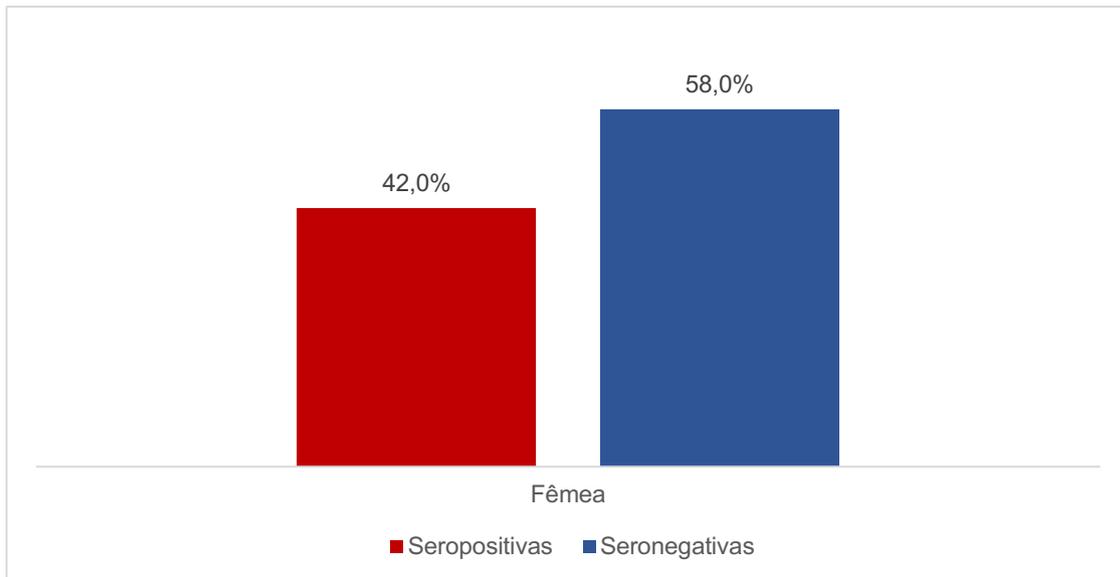


Gráfico 41. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos suínos fêmeas

Dos 53 machos testados, 45,3% foram seropositivos, dos quais 5,7% (3/53) apresentaram um título de 20 e 39,6% (21/53) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 42).

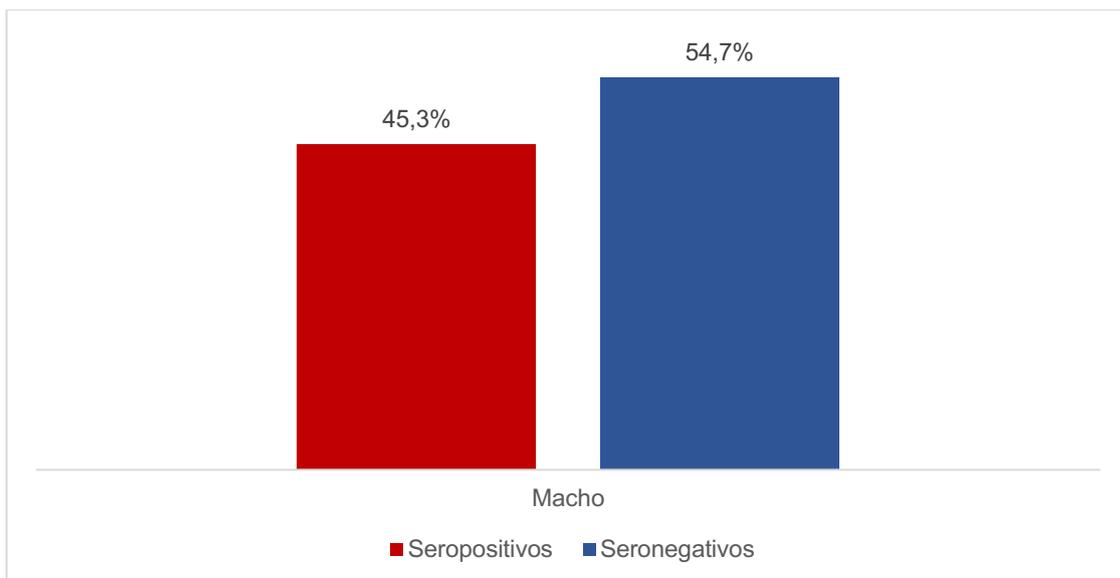


Gráfico 42. Seroprevalência de infecção por *T. gondii* nos suínos machos.

No caso dos suínos machos, dos 22 animais castrados, 4,5% (1/22) foram seropositivos com um título de 20 e 45,5% (10/22) foram seropositivos com um título igual ou superior a 400. No que diz respeito aos 31 suínos não castrados, 6,4% (2/31) foram seropositivos com um título de 20 e 35,5% (11/31) apresentaram um título igual ou superior a 400.

Dos 25 suínos jovens 8,0% (2/25) foram seropositivos para um título de 20 e 52,0% (13/25) apresentavam um título igual ou superior a 400 (Gráfico 43); dos 78 suínos adultos 38,5% (30/78) foram seropositivos, sendo que 7,7% (6/78) apresentaram um título de 20 e 30,8% (24/78) possuíam um título igual ou superior a 400 (Gráfico 44).

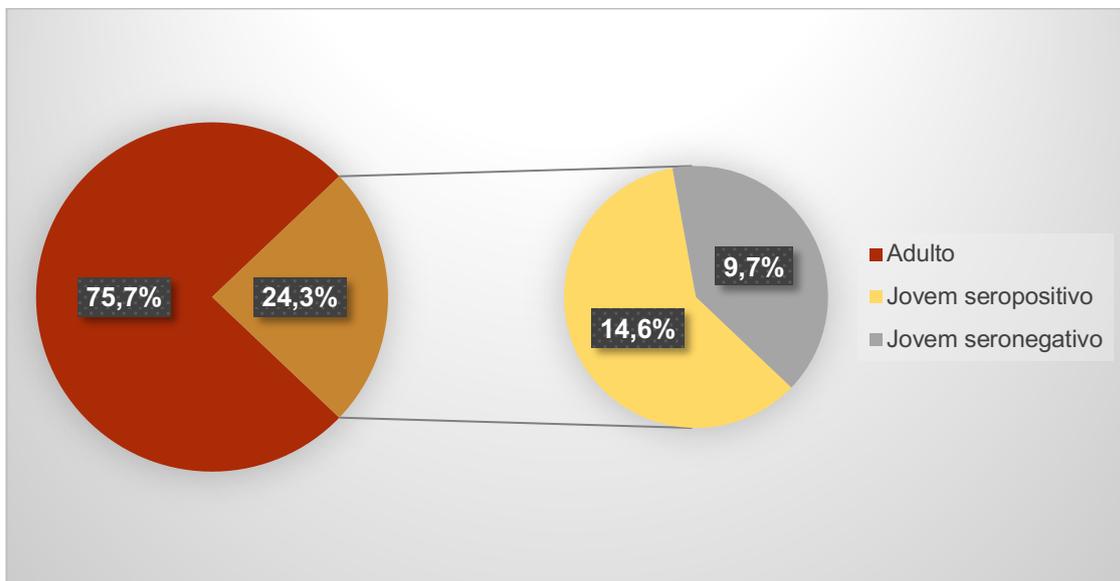


Gráfico 43. Distribuição dos suínos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em jovens.

Laranja-acastanhado: percentagem de jovens no estudo.

Amarelo: percentagem de jovens seropositivos a *T. gondii*, no universo dos suínos testados.

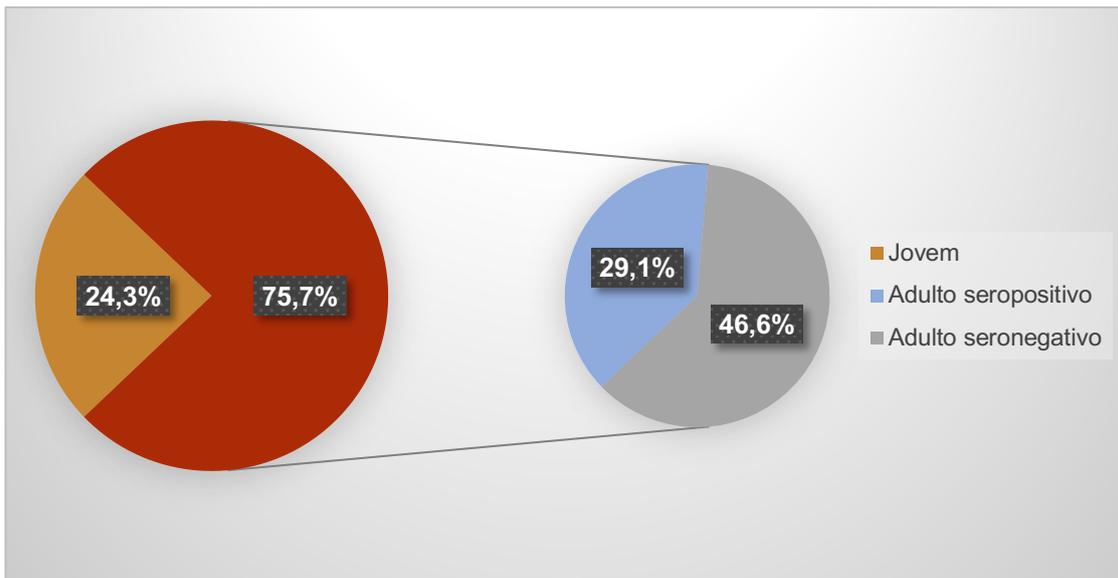


Gráfico 44. Distribuição dos suínos de acordo com a idade e seroprevalência de infecção por *T. gondii* em adultos.

Vermelho-tijolo: percentagem de adultos no estudo.

Azul: percentagem de adultos seropositivos a *T. gondii*, no universo dos suínos testados.

No que diz respeito à raça, 61,5% dos suínos da raça Large White foram seropositivos, dos quais 7,7% (1/13) apresentava um título de 20 e 53,8% (7/13) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 45).

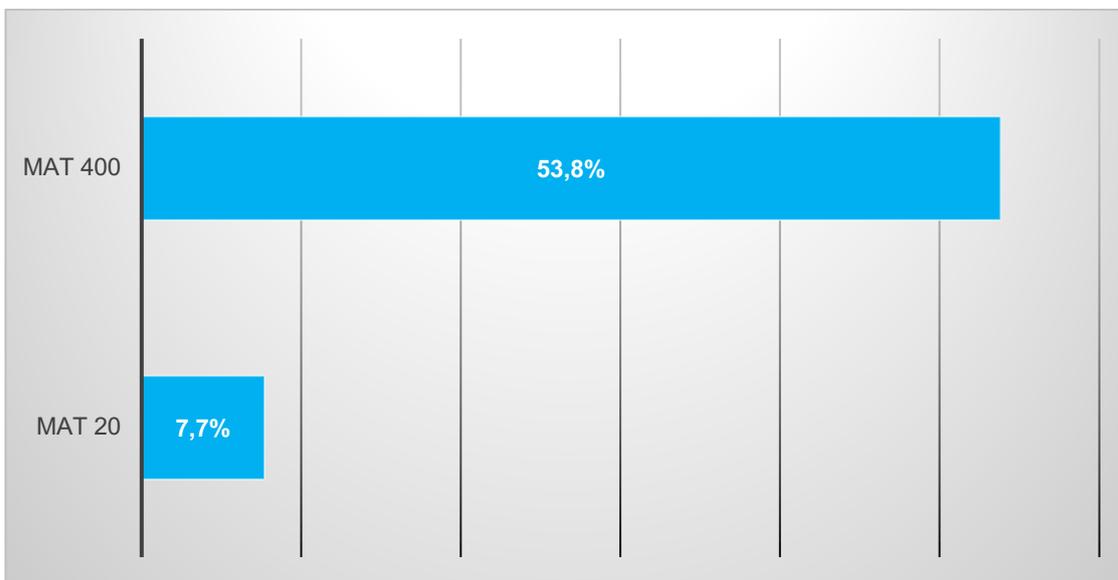


Gráfico 45. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400), em suínos raça Large White.

Dos 41,1% suínos raça cruzada seropositivos, 7,8% (7/90) seropositivos apresentavam um título de 20 e 33,3% (30/90) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 46).

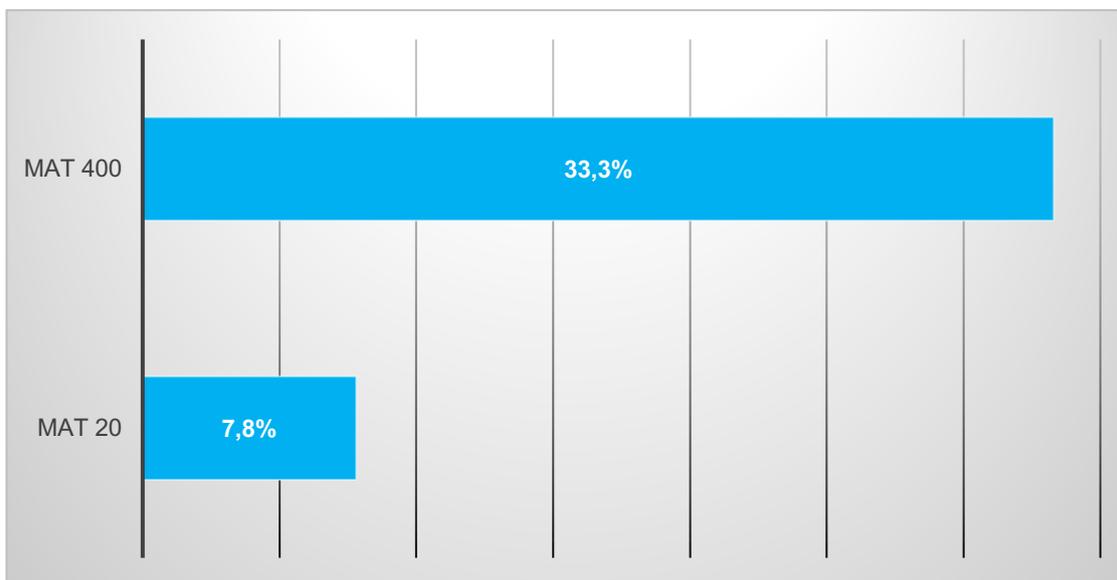


Gráfico 46. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400), em suínos de raça cruzada.

Na zona norte 45,2% (19/42) dos suínos foram seropositivos, 11,9% (5/42) com um título de 20 e 33,3% (14/42) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 47).

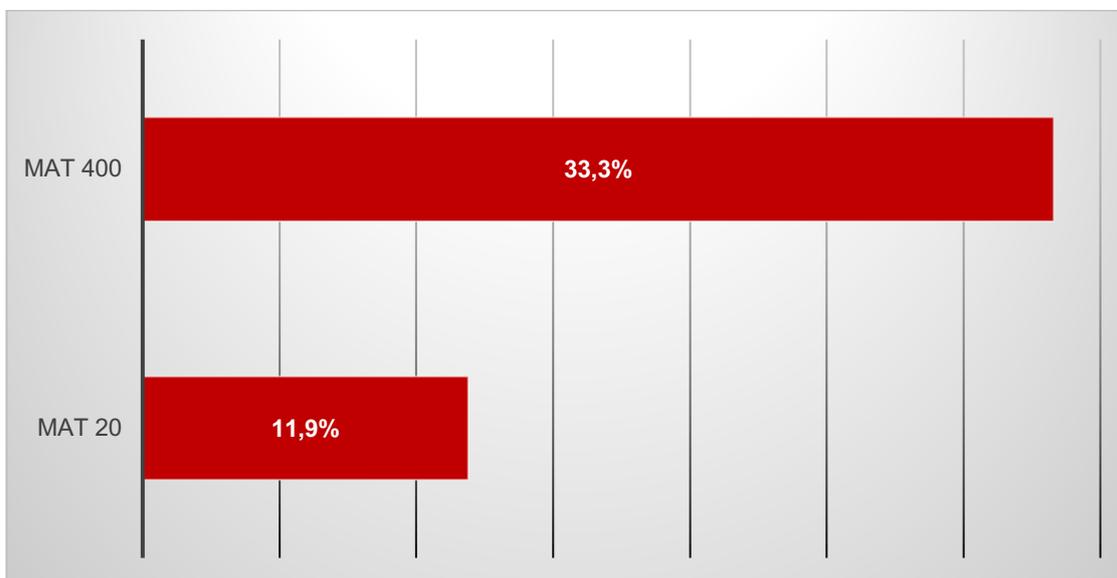


Gráfico 47. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em suínos, na zona norte.

Na zona centro, 50,0%(10/20) dos suínos foram seropositivos com um título igual ou superior a 400 (Gráfico 48).

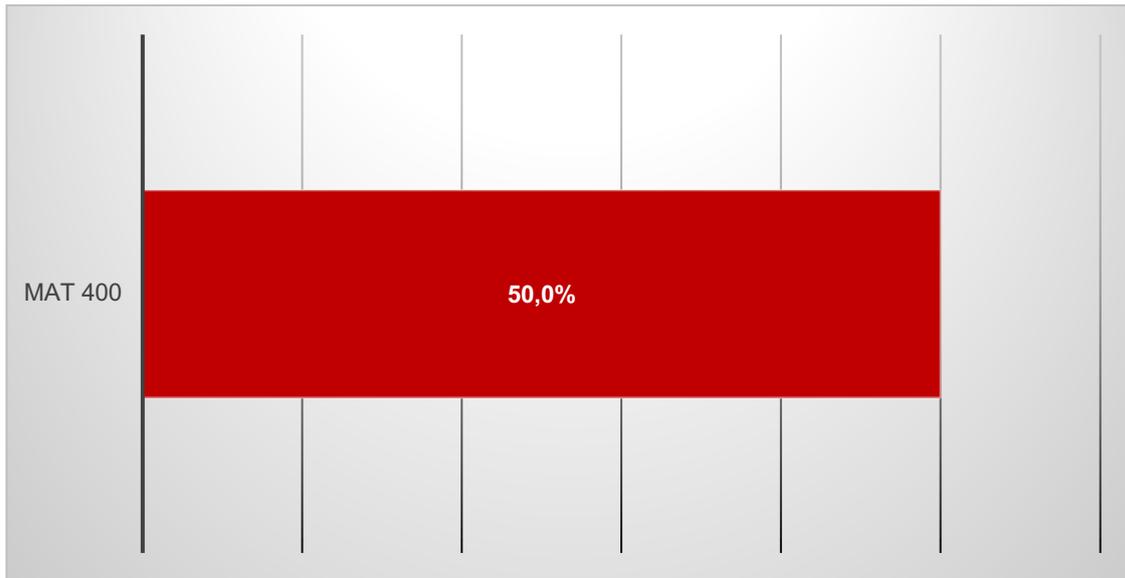


Gráfico 48. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em suínos, na zona centro.

Na zona sul, 39,0% (16/41) dos animais foram seropositivos, 7,3% (3/41) com um título de 20 e 31,7% (13/41) um título igual ou superior a 400 (Gráfico 49).

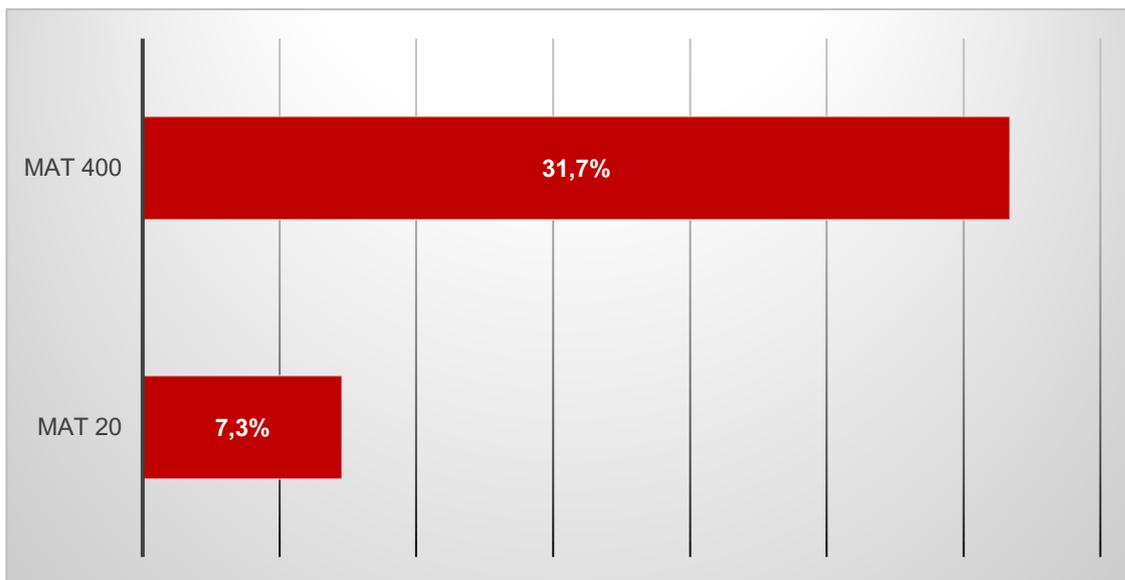


Gráfico 49. Seroprevalência por título (MAT 20 e MAT 400) em suínos, na zona sul.

A Tabela 10 apresenta os valores de seroprevalência de infecção por *T. gondii* em suínos de São Tomé de acordo com as variáveis independentes, e respectivos títulos; não sendo possível identificar qualquer fator de risco.

Tabela 10. Seroprevalência de infeção por *Toxoplasma gondii* em suínos de São Tomé de acordo com género, idade, raça e área geográfica.

Variável/categoria	Título MAT 20*	IC (%)	Título MAT 400	IC (%)
	% positivos (n)		% positivos (n)	
Género				
Feminino	42,0 (21)	28,2 – 56,8	32,0 (16)	19,5 – 46,7
Masculino	45,3 (24)	31,6 – 59,5	39,6 (21)	26,4 – 54,0
Idade				
Jovem	60,0 (15)	38,7 – 78,9	52,0 (13)	31,3 – 72,2
Adulto	38,5 (30)	27,7 – 50,2	30,8 (24)	20,8 – 42,2
Raça				
Large White	61,5 (8)	31,6 – 86,1	53,8 (7)	25,1 – 80,8
Cruzados	41,1 (37)	30,8 – 52,0	33,3 (30)	23,7 – 44,0
Área geográfica				
Norte	45,2 (19)	29,8 – 61,3	33,3 (14)	19,6 – 49,5
Centro	50,0 (10)	27,2 – 72,8	50,0 (10)	27,2 – 72,8
Sul	39,0 (16)	24,2 – 55,5	31,7 (13)	18,1 – 48,1
Total	43,7 (45)	33,9 – 53,8	35,9 (37)	35,8 – 55,7

*limiar de positividade (“cut-off”); IC: intervalo de confiança de 95%.

4.2.5. Seroprevalência de infeção por *T. gondii* nas várias espécies em estudo quando comparadas aos pares

Numa comparação aos pares foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre ovinos e suínos, ovinos e bovinos, caprinos e suínos, e caprinos e bovinos (Tabelas 11 e 12).

Assim, existe uma maior probabilidade de aquisição de infeção dos ovinos relativamente aos suínos nas duas titulações. Sendo que 68,4% dos ovinos foram seropositivos, enquanto os suínos apresentaram 43,7% de seropositivos com um título de 20. Para um título igual ou superior a 400, 65,3% dos ovinos foram seropositivos comparativamente aos 35,9% verificados nos suínos.

Os caprinos apresentaram uma maior probabilidade de infeção relativamente aos suínos nas duas titulações. Sendo que 70,1% dos caprinos foram seropositivos, enquanto os suínos apresentaram 43,7% de seropositivos com um título de 20. Para um título igual ou superior a 400, 67,0% dos caprinos foram seropositivos comparativamente aos 35,9% dos suínos.

Os ovinos demonstraram uma maior probabilidade de infecção relativamente aos bovinos nas duas titulações. Sendo que 68,4% dos ovinos foram seropositivos, enquanto os bovinos apresentaram 27,1% de seropositivos com um título de 20. Para um título igual ou superior a 400, 65,3% dos ovinos foram seropositivos comparativamente aos 25,0% dos bovinos.

Os caprinos apresentaram uma maior probabilidade de infecção relativamente aos bovinos nas duas titulações. Sendo que 70,1% dos caprinos foram seropositivos, enquanto os bovinos apresentaram 27,1% de seropositivos com um título de 20. Para um título igual ou superior a 400, 67,0% dos caprinos foram seropositivos comparativamente aos 25,0% dos bovinos.

No geral a seroprevalência mais elevada, em ambos os títulos, foi registada nos caprinos, seguindo-se por ordem decrescente os ovinos, os suínos e os bovinos.

Tabela 11. Valores de probabilidade (p) observados após comparação aos pares entre as espécies, de acordo com o limiar de positividade estabelecido

Seropositivos (%)	Suínos	Ovinos	Caprinos	Bovinos
Suínos (43,7%)	—	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,051$
Ovinos (68,4%)		—	$p < 0,792$	$p < 0,001$
Caprinos (70,1%)			—	$p < 0,001$
Bovinos (27,1%)				—

Tabela 12. Valores de probabilidade (p) observados após comparação aos pares entre as espécies, de acordo com título > ou = 400

Seropositivos (%)	Suínos	Ovinos	Caprinos	Bovinos
Suínos (35,9%)	—	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,182$
Ovinos (65,3%)		—	$p < 0,801$	$p < 0,001$
Caprinos (67,0%)			—	$p < 0,001$
Bovinos (25,0%)				—

4.3. Fatores de risco

As variáveis que apresentam no Qui-quadrado um valor de $p < 0,05$ foram consideradas para a análise de regressão logística múltipla.

A Tabela 13 apresenta os fatores de risco para a infecção por *T. gondii* em bovinos, ovinos e caprinos de São Tomé tendo em consideração o limiar de positividade.

Tabela 13. Fatores de risco para a infecção por *Toxoplasma gondii* em bovinos, ovinos e caprinos de São Tomé por regressão logística múltipla (limiar de positividade).

Espécie/variável/categoria	Nº de animais	Seroprevalência (%)	OR	IC (%)
Bovinos	48	27,1		
Área Geográfica				
Norte	30	10,0	1 (referência)	
Centro	4	0,0	0,0 ($p = 0,999$)	0,0–0,0
Sul	14	71,4	22,5 ($p < 0,001$)	4,3–118,8
Ovinos	98	68,4		
Área Geográfica				
Norte	52	57,7	1 (referência)	
Centro	33	93,9	11,4 ($p = 0,002$)	2,5–52,6
Sul	13	46,2	0,6 ($p = 0,456$)	0,2–2,1
Caprinos	97	70,1		
Idade				
Jovem	23	34,8	1 (referência)	
Adulto	74	81,8	6,7 ($p = 0,001$)	2,3–19,6
Área Geográfica				
Norte	43	55,8	1 (referência)	
Centro	27	88,9	4,4 ($p = 0,040$)	1,1–18,0
Sul	27	74,1	2,3 ($p = 0,158$)	0,7–7,2

Os bovinos provenientes da zona sul apresentaram uma seroprevalência significativamente mais elevada quando comparados com os da zona norte, possuindo um risco de aquisição de infecção 22,5 vezes superior (OR = 22,5; 95% IC: 4,3–118,8) aos animais que habitavam na zona norte.

Os ovinos provenientes da zona centro apresentaram mais 11,4 probabilidade de aquisição da infecção (OR = 11,4; 95% IC: 2,5–52,6) do que os ovinos da zona norte.

Os fatores de risco para a infecção por *T. gondii* em caprinos por ordem decrescente foram a idade adulta dos animais (OR = 6,7; 95% IC: 2,3–19,6) e a zona centro de proveniência (OR = 4,4; 95% IC: 1,1–18,0).

A Tabela 14 apresenta os fatores de risco para a infecção por *T. gondii* nos animais de São Tomé tendo em consideração o título igual ou superior a 400.

Tabela 14. Fatores de risco para a infecção por *Toxoplasma gondii* em bovinos, ovinos e caprinos de São Tomé por regressão logística múltipla (título 400)

Espécie/variável/categoria	Nº de animais	Título 400 (%)	OR	IC (%)
Bovinos	48	25,0		
Área Geográfica				
Norte	30	6,7	1 (referência)	
Centro	4	0,0	0,0 ($p = 0,999$)	0,0 – 0,0
Sul	14	71,4	35,0 ($p < 0,001$)	5,5 – 221,4
Ovinos	98	65,3		
Área Geográfica				
Norte	52	55,8	1 (referência)	
Centro	33	90,9	7,9 ($p = 0,002$)	2,1 – 29,3
Sul	13	38,5	0,5 ($p = 0,269$)	0,1 – 1,7
Caprinos	97	67,0		
Idade				
Jovem	23	34,8	1 (referência)	
Adulto	74	77,0	5,2 ($p = 0,002$)	1,8 – 14,6
Área Geográfica				
Norte	43	55,8	1 (referência)	
Centro	27	88,9	3,2 ($p = 0,075$)	0,9 – 11,5
Sul	27	74,1	1,5 ($p = 0,460$)	0,5 – 4,4

Os bovinos provenientes da zona sul apresentaram uma seroprevalência significativamente mais elevada quando comparados com os da zona norte, possuindo um risco de aquisição de infecção 35 vezes superior (OR = 35,0; 95% IC: 5,5–221,4) aos animais que habitavam na zona norte.

Os ovinos provenientes da zona centro apresentaram mais 7,9 probabilidade de aquisição da infecção (OR = 7,9; 95% IC: 2,1–29,3) do que os ovinos da zona norte.

Nos caprinos, o fator de risco para a infecção por *T. gondii*, foi a idade adulta dos animais apresentando mais 5,2 probabilidade de infecção (OR = 5,2; 95% IC: 1,8–14,6) do que em animais jovens.

5. DISCUSSÃO

O estudo das zoonoses, na medida em que estas representam uma preocupação constante para as autoridades e profissionais de saúde pública e médicos veterinários, levam à necessidade de mais investigações e à adoção de medidas profiláticas. Note-se que é cada vez mais reconhecido e praticado o conceito “One Health” (Uma Só Saúde, em Portugal), que representa uma visão holística que aborda desafios complexos e reconhece as ligações existentes entre a saúde humana, sanidade animal e o meio ambiente (FAO, 2017).

Neste trabalho científico foi possível constatar que, das amostras obtidas a nível das explorações, no caso dos bovinos e dos pequenos ruminantes, observou-se uma percentagem superior de fêmeas em relação aos machos. Pelo contrário, nas amostras de suínos, colhidas no matadouro, constatou-se uma percentagem relativamente superior de machos (51,5%) quando comparada com as fêmeas (48,5%). Isto deve-se ao facto de as fêmeas serem de elevado valor reprodutivo ao contrário dos machos que normalmente são refugados.

A raça foi apenas descrita como variável nos bovinos e suínos, pois nos pequenos ruminantes todos os animais testados pertenciam a uma única raça Nacional, considerada como autóctone na RDSTP.

Com base na área geográfica observou-se uma maior discrepância na distribuição dos bovinos devido unicamente à não homogeneidade das amostras colhidas; ao contrário do observado nas outras espécies testadas.

O presente trabalho representa, até ao momento de realização desta dissertação, o primeiro estudo realizado sobre a infeção por *T. gondii* em animais da RDSTP. A análise das 346 amostras revelou uma prevalência de anticorpos para *T. gondii* de 55,8%. Dos 193 animais seropositivos, 6,7% (13/193) eram bovinos, 34,7% (67/193) eram ovinos, 35,2% (68/193) eram caprinos e, 23,3% (45/193) eram suínos. Destes 193 animais seropositivos 92,2% apresentavam um título elevado, igual ou superior a 400.

Como foi referido ao longo desta dissertação, o método de diagnóstico de infeção por *T. gondii* escolhido foi o MAT, que é um teste simples que deteta IgG, excluindo as IgM, uma vez que o 2-ME utilizado nesta técnica inativa as IgM específicas e inespecíficas (Silva *et al.*, 2007). Assim sendo com a metodologia utilizada, é possível afirmar que a infeção apresenta um carácter crónico nos animais seropositivos.

Tendo como base as espécies alvo de estudo, com 70,1%, os caprinos representam a maior seroprevalência registada, seguida dos ovinos com 68,4%, embora a literatura geralmente indique que a prevalência de infeção é maior em ovinos do que em caprinos (Chikweto *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2013) devido à seleção de alimento, sendo que os caprinos optam normalmente por folhas de arbustos mais altos, enquanto os ovinos são pastores que tendem a comer gramíneas e trevos próximos ao solo sendo, portanto, mais propensos a contactarem com os oocistos do protozoário (Hamilton *et al.*, 2014). Foram descritas diferenças estatisticamente significativas entre estas espécies quando comparadas, respetivamente, a bovinos e suínos. Ou seja, entre os animais de interesse pecuário, os pequenos ruminantes são os mais suscetíveis à infeção por *T. gondii* (Innes, 1997).

A elevada seroprevalência observada nos pequenos ruminantes do presente estudo, pode dever-se ao sistema extensivo praticado pelas explorações analisadas, bem como à existência de condições climáticas adequadas na ilha de São Tomé, para a esporulação e sobrevivência de oocistos de *T. gondii* (Fan *et al.*, 2012). Animais que se alimentam de pastos, como bovinos e pequenos ruminantes, estão mais sujeitos à infeção por *T. gondii*, devido ao contacto com o solo, sendo por isso a seroprevalência mais elevada nos pequenos ruminantes comparativamente aos suínos (Hamilton *et al.*, 2014). Por sua vez, os suínos, que se alimentam à base de casca de cevada, fruta-pão, frutas como banana e jaca, matabala e vegetais, demonstraram neste estudo uma seroprevalência acima do esperado, com 43,7%, o que poderá levar a admitir que a forma de aquisição da infeção resida na transmissão horizontal. Esta via poderá ser a mais prevalente devido à alimentação rica em vegetais crus e frutas não lavados (Hung *et al.*, 2007), justificando assim seroprevalências elevadas em suínos e no ser humano na RDSTP.

Já em relação aos bovinos, com a menor seropositividade observada, 27,1%, é uma das espécies mais resistentes à toxoplasmose. Embora seja facilmente infetado por *T. gondii*, a infeção não resulta em doença ou aborto (Innes, 1997). Curiosamente, acredita-se que os bovinos alberguem menos quistos tecidulares de *T. gondii*, que não persistem durante a vida útil do hospedeiro (Dubey, 1986), ao contrário do que sucede nos ovinos e humanos (Innes, 1997). As razões para tal variação na suscetibilidade das espécies a este protozoário são desconhecidas, sendo que algumas espécies são extremamente sensíveis à infeção e parecem ficar sobrecarregadas antes que o sistema imunológico seja capaz de reagir, enquanto outras como humanos e ovinos, que são de suscetibilidade intermediária, o sistema imunitário atua mais eficazmente e geralmente é capaz de controlar a parasitemia, resultando em um encapsulamento do parasita (Pita Gon-dun *et al.*, 1999; Sharif *et al.*, 2007).

Dados registados na Nigéria detetaram valores de seroprevalência de 13,9% em bovinos, 29,1% em suínos (Onyiche e Ademola, 2015), e de 6,7% em ovinos e 4,6% em caprinos (Kamani *et al.*, 2010). Estes resultados, comparativamente aos obtidos neste trabalho científico, refletem um potencial aumento na RDSTP das seroprevalências em todas as espécies.

Para os pequenos ruminantes, os resultados obtidos entre o nordeste da Nigéria (Borno) e a RDSTP, podem dever-se ao facto de as condições climáticas serem diferentes entre estas duas áreas geográficas, uma vez que Borno é caracterizado por um clima de temperaturas altas durante todo o ano e uma humidade relativa baixa, que varia entre os 13% nos meses mais secos e de 70 a 80% nos meses de julho e agosto (Anon, 2003; Kamani *et al.*, 2010), ao contrário da RDSTP que apresenta uma temperatura média de 26°C e onde nas regiões de maior altitude a humidade relativa do ar ronda os 75%, e chove até na estação seca (Tenreiro, 1961; Menezes, 2003; Costa *et al.*, 2014).

Uma observação semelhante foi relatada no Irão (Sharif *et al.*, 2006) e na Sérvia (Ivana *et al.*, 2006), onde a maior prevalência de infeção por *T. gondii* foi observada em ambientes quentes e húmidos em comparação com meios frios e secos, devido a uma maior viabilidade dos oocistos deste parasita em condições húmidas (Rahimi *et al.*, 2015).

No caso dos bovinos, e apesar de estar relatada uma maior resistência ao parasita (Pita Gon-dun *et al.*, 1999; Sharif *et al.*, 2007), no presente estudo mais de ¼ da população apresentou-se infetada, ao contrário do descrito em Ibadan, na Nigéria por Onyiche e Ademola (2015). Estes resultados foram justificados por Onyiche e Ademola (2015), devido a deficiências no saneamento, falta de água potável e ao manuseio inadequado de resíduos, razões estas que também poderão estar na origem da elevada infeção registada na RDSTP. No entanto, mais estudos são necessários por forma a identificar potenciais fontes de transmissão.

Foi observada uma seroprevalência de 43,7% em suínos de São Tomé, sendo superior aos 29,1% obtidos por Onyiche e Ademola (2015) na região de Ibadan, na Nigéria. *T. gondii* é raramente detetado em confinamentos de suínos criados em países desenvolvidos (Dubey, 2009), enquanto nos países subsaarianos, mais especificamente, no Burkina Faso, os porcos são criados principalmente de maneira tradicional em pequenas comunidades agrícolas (Carabin *et al.*, 2015; Timbilfou *et al.*, 2012). A seroprevalência no Burkina Faso (29%) é semelhante as apresentadas nos outros países africanos na Tabela 10, confirmando a importância dos porcos como hospedeiros intermediários de *T. gondii* (Bamba *et al.*, 2016). Os quistos musculares de *T. gondii* podem persistir, na carne de suínos, por um longo período

de tempo, sendo este protozoário identificado como um dos riscos biológicos mais relevantes no contexto de inspeção sanitária de suínos (EFSA, 2007,2011). No entanto, a carne destes hospedeiros entra na cadeia alimentar sem uma inspeção apropriada de modo a verificar a presença de *T. gondii* (Domy *et al.*, 2009; Blagojevic e Antic, 2014). Em comparação com a carne bovina e de aves, é mais provável que a carne de porco esteja infetada com *T. gondii* devido à elevada suscetibilidade dos suínos à infeção (Hill e Dubey, 2013).

É importante ainda realçar que estas diferenças na seroprevalência entre a Nigéria e a RDSTP poderão advir do método serológico utilizado no estudo (Hashemi-Fesharki, 1996; Dubey, 2010), tendo sido utilizado ELISA por Onyiche e Ademola (2015) e Kamani *et al.* (2010), e o MAT nesta dissertação de mestrado. ELISA permite a análise de um número elevado de amostras, mas tem como desvantagem uma maior complexidade em comparação com o MAT (Garcia *et al.*, 2006) que é considerado sensível e específico para o diagnóstico da infeção crónica por *T. gondii* em animais (Dubey *et al.*, 1995).

No presente trabalho, das 236 fêmeas testadas 60,2% foram seropositivas; e dos 110 machos testados 46,4% foram seropositivos para infeção por *T. gondii*. Dependendo da espécie estudada observou-se uma seroprevalência superior nos suínos machos, e nas restantes espécies a seroprevalência mais elevada pertenceu às fêmeas; apesar disso não houve diferenças significativas.

A seropositividade observada segundo a idade, foi de 44,3% para jovens e de 59,2% para adultos. Dependendo da espécie observou-se uma seroprevalência superior nos adultos, no caso dos pequenos ruminantes e dos bovinos, e nos suínos o inverso. Nos caprinos foi identificado como fator de risco para a infeção por *T. gondii* a idade adulta apresentando os caprinos adultos 5,2 vezes mais probabilidade de serem infetados do que os animais jovens.

Estes resultados, por género e por idade, poderão comprovar que as diferenças na seroprevalência, entre pequenos ruminantes jovens e adultos, estão provavelmente relacionadas com a transmissão oral, sendo que os animais mais velhos estão expostos por mais tempo às formas infetantes do protozoário (Lundén *et al.*, 1994). Os anticorpos de *T. gondii* adquiridos colostralmente em ovelhas e outros animais declinam para níveis indetetáveis aos 3 meses de idade, comprovando assim que a transmissão congénita não está associada a uma espécie animal em particular (Waldeland, 1976; Dubey, 2010).

Na categoria raça apenas foi possível dividir os efetivos bovinos (4,2% pura e 95,8% cruzada) e suíno (12,6% Large White e 87,4% cruzada). No caso específico dos suínos, os resultados obtidos remetem para uma seroprevalência superior em porcos da raça Large

White, de 61,5%, relativamente aos cruzados, o que não é consistente com outros estudos realizados no Gana, e utilizando IFAT, que referem uma seroprevalência de 38,8% em Large White comparativamente a 46,8% em híbridos (Arko-Mensah *et al.*, 2000). De qualquer modo, não houve diferenças estatisticamente significativas na variável raça.

A seropositividade observada de acordo com a área geográfica foi de 45,5% na zona norte; 76,5% na zona centro e, 54,7% na zona sul. Sendo que, dependendo da espécie, observou-se uma seroprevalência mais elevada nos ovinos, caprinos e suínos do centro; no caso dos bovinos a seroprevalência mais elevada foi registada na zona sul.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no caso dos bovinos, ovinos e caprinos. Sendo que, bovinos provenientes da zona sul possuem um risco de aquisição de infeção superior aos animais que habitavam na zona norte, podendo este resultado ser um reflexo de marcas de pobreza mais visíveis na zona sul do país, nos distritos de Cantagalo e Caué (Silva, 2014). Os ovinos e caprinos provenientes da zona centro apresentaram maior probabilidade de aquisição da infeção do que os animais da zona norte.

Estes resultados poderão indicar potenciais fontes de transmissão, como a qualidade de água fornecida, manejo higiénico, bem como contacto com gatos domésticos (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2001). É importante destacar que na cidade de São Tomé, na zona centro, devido às boas condições de higiene praticadas, a aquisição de infeção por *T. gondii* poderá estar relacionada a um maior contacto com gatos domésticos. No entanto, a realização de futuros trabalhos científicos é importante para a confirmação destas observações.

A nível humano foram diversos os estudos realizados sobre a seroprevalência de infeção por *T. gondii* na RDSTP, bem como em países próximos. Assim, entre populações humanas da RDSTP, e utilizando o LAT foi reportada uma seroprevalência de 21,5% (26/121) em crianças de idade pré-escolar (Fan *et al.*, 2006), e de 63,1% (161/255) em alunos que frequentavam o 1º ciclo do ensino básico (Fan *et al.*, 2012) e de 75,2% (375/499) em mulheres grávidas (Hung *et al.*, 2007).

A seroprevalência observada na RDSTP é superior à reportada em países com clima semelhante e próximos geograficamente à RDSTP, como a Nigéria, com 32,0% (Ohiole e Isaac, 2016), Gabão com 56,0% (Mickoto *et al.*, 2010), e os Camarões com 70,0% (Njunda *et al.*, 2011) em mulheres grávidas. Para além das variações de clima, existem ainda as culturais, sendo que apenas se observa uma alimentação idêntica, à base de uma dieta rica em hortícolas, em países como a RDSTP e os Camarões (Silva, 2014). Esta diferença na dieta poderá estar na origem da seroprevalência elevada em mulheres grávidas verificada

para estes dois países, 70,0% nos Camarões (Njunda *et al.*, 2011) e 75,2% RDSTP (Fan *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2007), concluindo que a fonte de infeção poderá estar associada à exposição a fezes de gato e ao contacto com solo ou água contaminada por oocistos (Fan *et al.*, 2012), pois remete a uma elevada probabilidade de ingestão do parasita em alimentos crus como vegetais e frutas; água ou solo contaminados. Embora os gatos domésticos tenham sido identificados como um fator de risco para a aquisição da infeção (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2001), estudos realizados nos Camarões não verificaram uma associação significativa entre a posse de gatos, ou o contacto com estes animais, e a infeção por *T. gondii* (Martinez *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2013; Wam *et al.*, 2016).

Estes factos permitem afirmar que, apesar da elevada ocorrência em animais domésticos de São Tomé refletir uma situação alarmante a nível da saúde pública, o acesso aos alimentos depende também do rendimento familiar. Tendo em consideração o elevado nível de pobreza da população, o poder de compra é baixo (Santo, 2008). A carne e o peixe ocupam uma grande parte da despesa total do agregado familiar, fazendo com que nenhuma das famílias inquiridas por Silva (2014) consumisse carne de vaca, por se tratar do alimento mais caro e de baixa disponibilidade na RDSTP. A carne caprina e ovina também apresenta elevados custos e difícil disponibilidade e acesso para as famílias santomenses. O produto de origem animal mais consumido é o peixe, sendo de extrema importância, já que deste provem grande parte do aporte proteico da população, seguindo-se a galinha e o búzio-da-terra (Silva, 2014).

6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A infeção pelo protozoário *T. gondii* é endémica em praticamente todo o mundo, provocando uma significativa morbilidade e mortalidade em crianças infetadas congenitamente ou em indivíduos imunocomprometidos, possuindo um elevado impacto socioeconómico em termos de saúde pública, com custos elevados no tratamento.

Assim, o estudo presente é de especial importância, considerando o potencial zoonótico e devido à falta de dados relativos a *T. gondii* em espécies animais da República Democrática de São Tomé e Príncipe. A investigação descrita nesta dissertação de mestrado pretendeu estudar a seroprevalência e identificar potenciais fatores de risco associados à infeção por *T. gondii* em bovinos, ovinos, caprinos e suínos de São Tomé.

Este trabalho permitiu verificar que a infeção pelo protozoário ocorre nos animais domésticos da ilha de São Tomé, sendo a prevalência geral de anticorpos para este parasita de 55,8%. Com este valor de seroprevalência, e embora não estejam reportados casos clínicos de toxoplasmose em nenhuma das espécies alvo de estudo, conclui-se que este parasita merece destaque na lista de diagnósticos diferenciais em patologias reprodutiva, neurológica ou de outra natureza.

Foi ainda determinado um risco de aquisição da infeção superior em caprinos relativamente às restantes espécies. No entanto, mais estudos são necessários por forma a identificar potenciais fontes de transmissão.

É de realçar a importância de um clima quente e húmido para o desenvolvimento de *T. gondii*, pois observa-se uma maior seroprevalência da infeção. Apesar de a República Democrática de São Tomé e Príncipe apresentar-se geograficamente próxima de países como a Nigéria, Gabão e Camarões, o clima é apenas semelhante em algumas regiões.

O crescimento mundial, em associação com as pesquisas realizadas, bem como a globalização contribuem para a consciencialização da população.

Assim sendo, e tendo em consideração que a educação é o ponto-chave para o conhecimento dos fatores de risco, conclui-se que os profissionais de saúde médica e médico-veterinária são fundamentais na informação das populações e na prevenção e controlo desta importante zoonose.

Até ao momento de redação desta dissertação, este é considerado o primeiro estudo sobre a prevalência de anticorpos para *T. gondii* em animais domésticos de São Tomé.

Contudo, mais estudos são necessários, nomeadamente em outras espécies hospedeiras, incluindo o gato, de modo a compreender melhor a relação parasita-hospedeiro e a implementar medidas eficazes de controlo e prevenção desta zoonose.

Bibliografía

- Afonso, E., Thulliez, P., Gilot-Fromont, E. (2006). Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *Int. J. Parasitol.*, 36: 1373–1382. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.07.010.
- Akinwale, M. E., Charles, J. E., Pikka, J. (2017). Toxoplasmosis – Awareness and knowledge among medical doctors in Nigeria. *J. P. One.* doi: 10.1371/journal.pone.0189709.
- Al-Kappany, Y. M., Lappin, M. R., Kwok, O. C. H., Abu-Elwafa, S. A., Hilali, M., Dubey, J. P. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and Concurrent *Bartonella* spp., Feline Immunodeficiency Virus, Feline Leukemia Virus, and *Dirofilaria immitis* Infections in Egyptian Cats. *J. Parasitol.*, 97: 256-258. *American Soc. of Parasitol.*, doi: 10.1645/GE-2654.1.
- Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma Gondii*. *Nature Publishing Group*, 5: 162-170. doi: 10.1038/nri1547.
- Almería, S., Cabezón, O., Paniagua, J., Terriza, D. C., Ruiz, S. J., Montes, A. A., Dubey, J. P., García-Bocanegra, I. (2018). *Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem. *Parasitol. Res.* doi: 10.1007/s00436-017-5705-6.
- Alvarado-Esquivel, C., García-Machado, C., Vitela-Corrales, J., Villena, I., Dubey, J. P. (2011) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Durango State, Mexico. *Vet. Parasitol.*, 183: 43-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.06.021.
- Alvarado-Esquivel, C., Rodríguez-Peña, S., Villena, I., Dubey, J. P. (2012) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. *J. Parasitol.*, 98: 944–945. doi:10.1645/GE-3174.1.
- Arko-Mensah, J., Bosompem, K. M., Canacoo, E. A., Wastling, J. M., Akanmori, B. D. (2000). The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. *Acta Tropica* 76: 27–31.
- Bamba, S., Cissé, M., Sangaré, I., Zida, A., Ouattara, S., Guiguemdé, R. T. (2017). Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *BMC Inf. Dis.* doi: 10.1186/s12879-017-2583-6.
- Bamba, S., Halos, L., Tarnagda, Z., Alanio, A., Macé, P., Moukoury, S., Sangaré, I., Guiguemdé, R., Costa, J. M., Bretagne, S. (2016). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *International J. of Food Microbiology* 230: 10–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.016.
- Baran, D. A., Alwarshetty, M. M., Alvi, S., Arroyo, L. H., Lubitz, S., Pinney, S., Gass, A. L., Zucker, M. J. (2006). Is toxoplasmosis prophylaxis necessary in cardiac transplantation? Long-term follow-up at two transplant centers. *J. Heart Lung Transplant*, 25: 1380–1382. doi: 10.1016/j.healun.2006.08.001.
- Barragan, A., Sibley, L. D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.*, 11: 426-430.
- Basavaraju, A. (2016). Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. *Trop. Parasitol.* 6:129-35. doi: 10.4103/2229-5070.190817.
- Benavides, J., Maley, S., Pang, Y., Palarea, J., Eaton, S., Katzer, F., Innes, E. A., Buxton, D., Chianini, F. (2011). Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally

infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.*, 179: 209–215. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.001.

Bisvigou, U., Mickoto, B., Ngoubangoye, B., Tsonga, S. M., Akue, J. P., Nkoghe, D. (2009). Seroprevalence of toxoplasmosis in a rural population in south-west Gabon. *Parasite* 16: 240-242. doi: 10.1051/parasite/2009163240.

Bresciani, K. D., Costa, A. J., Toniollo, G. H., Luvizzoto, M. C., Kanamura, C. T., Moraes, F. R., Perri, S. H., Gennari, S. M. (2009). Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. *Parasitol. Res.*, 104: 1213–1217. doi: 10.1007/s00436-008-1317-5.

Çakmak, D. Ö., Karatepe, B. (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Sheep from Nevşehir Province in Turkey. *Turkiye Parazitoloj Derg*, 41: 148-151. doi: 10.5152/tpd.2017.5245.

Calero-Bernal, R., Gómez-Gordo, L., Saugar, J. M., Frontera, E., Pérez-Martín, J. E., Reina, D., Serrano, F. J., Fuentes, I. (2013) Congenital toxoplasmosis in wild boar (*Sus scrofa*) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. *J. Wildl. Dis.* 49: 1019–1023. doi:10.7589/2013-01-024.

Castaño, P., Fuertes, M., Regidor-Cerrillo, J., Ferre, I., Fernández, M., Ferreras, M. C., Moreno-Gonzalo, J., González-Lanza, C., Pereira-Bueno, J., Katzer, F., Ortega-Mora, L.M., Pérez, V., Benavides, J. (2016) Experimental ovine toxoplasmosis: influence of the gestational stage on the clinical course, lesion development and parasite distribution. *Vet. Res.* 47: 43. doi:10.1186/s13567-016-0327-z.

Condições meteorológicas médias de São Tomé. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/52893/Clima-caracter%C3%ADstico-em-São-Tomé-São-Tomé-e-Pr%C3%ADncipe-durante-o-ano>. Acesso a: 7 de Junho, 2018.

Côté, E. (2011) *Clinical Veterinary Advisor: Dogs and Cats*. Elsevier Health Sciences.

Dardé, M.L. (2008). *Toxoplasma gondii*, “New” genotypes and virulence. *Parasite*, 15: 366-371. doi: 10.1051/parasite/2008153366.

Davidson, M. G. (2000). Toxoplasmosis. *Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract.*, 30: 1051–1062.

Davoust, B., Mediannikov, O., Roqueplo, C., Perret, C., Demoncheaux, J. P., Sambou, M., Guillot, J., Blaga, R. (2015) Serological survey of animal toxoplasmosis in Senegal. *Bull Soc Pathol. Exot.*, 108: 73-7. doi: 10.1007/s13149-014-0403-4.

Deksne, G., Petrusēviča, A., Kirjušina, M. (2013). Seroprevalence and Factors Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Cats from Urban Areas in Latvia. *J. of Parasitol.*, 99: 48-50. American Society of Parasitologists. doi: 10.1645/GE-3254.1.

Diakoua, A., Papadopoulos, E., Panousis, N., Giadinis, N. (2013). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. *Parasitol.* 198: 387–390. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.09.017.

Djokic, V., Klun, I., Musella, V., Rinaldi, L., Cringoli, G., Sotiraki, S., Djurkovic-Djakovic, O. (2014) Spatial epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in goats in Serbia. *Geospat. Health* 8: 479-88. doi: 10.4081/gh.2014.37.

- Dubey, J. P. (1998b). Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.* 74: 75–77.
- Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, 126: 57–72. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.005.
- Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years. *Vet. Parasitol.*, 164: 89–103. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.018.
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*, second ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 336 pp.
- Dubey, J. P. (2010a). *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. *Zoonoses Pub. Health*, 57: 60–73. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x.
- 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., Hill, D. E., Rozeboom, D. W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L. R., Kwok, O. C. H., Su, C. (2012). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Vet. Parasitol.* 188: 14–18. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.008.
- Dubey, J. P., Huong, L. T., Lawson, B. W., Subekti, D. T., Tassi, P., Cabaj, W., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Kwok, O. C., Su, C. (2008b). Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. *J. Parasitol.*, 94: 68–71. doi: 10.1645/GE-1362.1.
- Dubey, J. P., Jones J.L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.*, 38: 1257–1278. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.007.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*, 11: 267-299.
- Dubey, J. P., Vianna, M. C. B., Sousa, S., Canada, N., Meireles, S., Correia da Costa, J. M., Marcet, P. L., Lehmann, T., Dardé, M.L., Thulliez, P. (2006) Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Portugal. *J. Parasitol.*, 92: 184–186. doi:10.1645/GE-652R.1.
- Elfahal, A. M., Elhassan, A. M., Hussien, M. O., Enan, K. A., Musa, A. B., El Hussein, A. M. (2013) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dairy Cattle with Reproductive Problems in Sudan. *ISRN Vet. Sci.*, 19: 895165. doi: 10.1155/2013/895165.
- Erkılıç, E. E., Mor, N., Babür, C., Kırmızıgül, A. H., Beyhan, Y. E. (2016) The Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Cats from the Kars Region, Turkey. *Israel J. of Vet. Medicine* Vol. 71.
- Esteves, F., Aguiar, D., Rosado, J., Costa, M.L., Sousa, B., Antunes, F., Matos, O. (2014). *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. *Vet. Parasitol.* 200: 8–12. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.12.017.

Fan, C. K., Hung, C. C., Su, K. E., Chiou, H. Y., Gil, V., Ferreira, M. C., Tseng, L. F. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among inhabitants in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.04.010.

Fan, C. K., Hung, C. C., Su, K. E., Sung, F. C., Chiou, H. Y., Gil, V., Ferreira, M. C., de Carvalho, J. M., Cruz, C., Lin, Y. K., Tseng, L. F., Sao, K. Y., Chang, W. C., Lan, H. S., Chou, S. H. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pre-schoolchildren aged 1-5 years in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe, Western Africa. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.07.013.

Fan, C. K., Lee, L. W., Liao, C. W., Huang, Y. C., Lee, Y. L., Chang, Y. T., Costa, A. S. R. J., Gil, V., Chi, L. H., Nara, T., Tsubouchi, A., Akinwale, O. P. (2012). *Toxoplasma gondii* infection: relationship between seroprevalence and risk factors among primary schoolchildren in the capital areas of Democratic Republic of São Tomé and Príncipe, West Africa. Parasites & Vectors 13;5:141. doi: 10.1186/1756-3305-5-141.

Ferguson, D. J. (2009) Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 39: 871- 875. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.01.003.

Foulon, W., Pinon, J. M., Stray-Pedersen, B., Pollak, A., Lappalainen, M., Decoster, A., Villena, I., Jennum, P. A., Hayde, M., Naessens, A. (1999). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. Am. J. Obstet. Gynecol., 181: 843– 847.

Frenkel, J. K. Lindsay, D. S., Parker, B. B., Dobesh, M. (2003) Dogs as possible mechanical carriers of *Toxoplasma*, and their fur as a source of infection in young children. Int. J. Infect. Dis., 7: 292–293.

Freyre, A., Choromanski, L., Fishback, J.L., Popiel, I. (1993). Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol.. 79: 716–719.

Freyre, A., Dubey, J. P., Smith, D. D., Frenkel, J. K. (1989). Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. J. Parasitol., 75: 750-755.

Fundo de População das Nações Unidas (do inglês “United Nations Population Fund”). World Population Dashboard Sao Tome and Principe. (2018) Disponível em: <https://www.unfpa.org/data/world-population/ST>. Acesso a: 24 de Março, 2018.

Fuentes, I., Rodriguez, M., Domingo, C. J., Del Castillo, F., Juncosa, T., Alvar, J. (1996) Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. J. Clin. Microbiol., 34: 2368– 2371.

Fuglewicz, A. J., Piotrowski, P., Stodolak, A. (2017) Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia. Advances in Clin. and Exp. Med., 1031–1036. doi: 10.17219/acem/61435.

García-Bocanegra, I., Cabezón, O., Hernández, E., Martínez-Cruz, M. S., Martínez-Moreno, Á., Martínez-Moreno, J. (2013) *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. J. Parasitol. 99: 438–440. doi:10.1645/12-27.1.

García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J. P., Casal, J., Martín, G. E., Cabezón, O., Perea, A., Almería, S. (2010a). Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma*

gondii in domestic pigs from Spain. Parasitol. Int. 59: 421–426. doi:10.1016/j.parint.2010.06.001.

García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Sibila, M., Dubey, J. P., Cabezón, O., Martín, G., Almería, S. (2010b). Duration of maternally derived antibodies in *Toxoplasma gondii* naturally infected piglets. Vet. Parasitol. 170: 134–136. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.042.

Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., Sher, A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J. Immunol., 146: 286–292.

Gazzonis, A. L., Veronesi, F., Di Cerbo, A. R., Zanzani, S. A., Molineri, G., Moretta, I., Moretti, A., Piergili Fioretti, D., Invernizzi, A., Manfredi, M. T. (2015). *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Northern Italy - prevalence and risk factors. Ann. Agric. Environ. Med. AAEM 22: 62–68. doi:10.5604/12321966.1141370.

Gebremedhin, E. Z., Dima, N., Beyi, A. F., Dawo, F., Feyissa, N., Jorga, E., Di Marco, V., Vitale, M. (2016) Toxoplasmosis in camels (*Camelus dromedarius*) of Borana zone, Oromia region, Ethiopia: seroprevalence and risk factors. Trop. Anim. Health Prod. 1599-1606. doi: 10.1007/s11250-016-1133-3.

Gebremedhin, E. Z., Tesfamaryam, G., Yunus, H. A., Duguma, R., Tilahun, G., Di Marco, V., Vitale, M. (2015a). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in free-range chickens (*Gallus domesticus*) of Central Ethiopia. Epidemiol. Infect. 143: 608–617. doi: 10.1017/S0950268814000971.

Gebremedhin, E.Z., Kebeta, M.M., Asaye, M., Ashenafi, H., Di Marco, V., Vitale, M., (2015b). First report on seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Central Ethiopia. BMC Vet. Res. 11: 59. doi: 10.1186/s12917-015-0384-y.

Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Belkilani, S., Hermitte, P., Gibout, O., Geers, R., Villena, I. (2009). Landscape, herd management and within-herd seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in beef cattle herds from Champagne-Ardenne, France. Vet. Parasitol. 161 (2009) 36–40, doi:10.1016/j.vetpar.2008.12.004.

Gos, M. L., Manazza, J. A., Späth, E. J. A., Pardini, L., Fiorentino, M. A., Unzaga, J. M., Moré, G., Venturini, M. C. (2017) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats from two Argentinean provinces. Open Vet. J. 7: 319-322. doi: 10.4314/ovj.v7i4.5.

Guo, M., Dubey, J. P., HILL, D., Buchanan, R. L., Gamble, H. R., Jones, J. L., Pradhan, A. K. (2015). Prevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Meat Animals and Meat Products Destined for Human Consumption. J. of Food Prot., 78: 457–476. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-328.

Halonen, S. K., Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. Handb Clin Neurol 114: 125-145. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.

Hamidinejat, H., Ghorbanpour, M., Nabavi, L., Hajikolaie, M. R. H., Jalali, M. H. R. J. (2010) Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in female cattle in south-west of Iran. Trop Anim. Health Prod., 42: 899–903. doi: 10.1007/s11250-009-9505-6.

- Hamilton, C. M., Katzer, F., Innes, E. A., Kelly, P. J. (2014) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in small ruminants from four Caribbean islands. *Parasites & Vectors* 2014, 7: 449. doi: 10.1186/1756-3305-7-449.
- Hecker, Y. P., Masson, F. M., Armendano, J. I., Cora, J., Olivares, C. F., Gual, I., Pardini, L., Moore, D. P., Moré, G., Cantón, G. J. (2018) Evaluation of frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. and transmission routes in sheep from Humid Pampa, Argentina. *Acta Parasitol.* 63: 416-421. doi: 10.1515/ap-2018-0048.
- Hegab, S. M., Al-Mutawa, S. A. (2003). Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin. Exp. Med.* 3: 84-105. doi: 10.1007/s10238-003-0011-2.
- Herrero, L., Gracia, M. J., Arquillué, C. P., Lázaro, R., Herrera, M., Herrera, A., Bayarri, S. (2016). *Toxoplasma gondii*: Pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet. Parasitol.*, 224: 52–59. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.05.010.
- Hill, D. E., Chirukandoth, S., Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Health Res. Rev.*, 6: 41–61.
- Hill, D. E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H. R., Dubey, J. P. (2010). Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the national animal health monitoring survey (Swine 2006). *Zoonoses Pub. Health*, 57: 53–59. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01275.x.
- Hill, D., Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*, 8: 634–640.
- Hiszczyńska-Sawicka, E., Gatkowska, J.M., Grzybowski, M.M., Długońska, H. (2014). Veterinary vaccines against toxoplasmosis. *Parasitol.* 141: 1365–1378. doi:10.1017/S0031182014000481.
- Holec-Gasior, L., Dominiak-Górski, B., Kur, J. (2015) First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep in Pomerania, northern Poland. *Ann. Agric. Environ Med.*, 604-607. doi: 10.5604/12321966.1185761.
- Hung, C. C., Fan, C. K., Su, K. E., Sung, F. C., Chiou, H. Y., Gil, V., Ferreira, M. C., de Carvalho, J. M., Cruz, C., Lin, Y. K., Tseng, L. F., Sao, K. Y., Chang, W. C., Lan, H. S., Chou, S. H. (2007). Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 101:134-139. doi: 10.1016/j.trstmh.2006.04.012.
- Innes, E. A. (1997) Toxoplasmosis: Comparative species susceptibility and host immune response. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 20: 131-138.
- Innes, E. A. (2010). A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* 57(1):1-7. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x.
- Innes, E. A., Bartley, P. M., Maley, S., Katzer, F., Buxton, D. (2009). Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104:246-251.
- Jokelainen, P., Simola, O., Rantanen, E., Näreaho, A., Lohi, H., Sukura, A. (2012). Feline toxoplasmosis in Finland: cross-sectional epidemiological study and case series study. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24:1115-1124. doi: 10.1177/1040638712461787.

- Kamani, J., Mani, A. U., Egwu, G. O. (2010) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno state, Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* (2010) 42: 793–797. doi: 10.1007/s11250-009-9488-3.
- Kijlstra, A., Eissen, O. A., Cornelissen, J., Munniksma, K., Eijck, I., Kortbeek, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45: 3165–3169. doi: 10.1167/iovs.04-0326.
- Kim, J. H., Kang, K.I., Kang, W. C., Sohn, H. J., Jean, Y. H., Park, B. K., Kim, Y., Kim, D. Y. (2009). Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. *J Vet. Sci.*, 10: 147–151.
- Klun, I., Djurkovic-Djakovic, O., Katic-Radivojevic, S., Nikolic, A. (2006). Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. *Vet. Parasitol.* 135: 121–131. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.08.010.
- Lappin, M. R. (2010). Update on the Diagnosis and Management of *Toxoplasma gondii* Infection in Cats. *Top. in Companion Anim. Med.*, 25: 136-141. doi: 10.1053/j.tcam.2010.07.002.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale G. F., Loeblich A. R., Lynn L. J., 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.
- Li, F., Wang, S. P., Wang, C. J., He, S. C., Wu, X., Liu, G. H. (2016). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats in Hunan province, China. 23:44. doi: 10.1051/parasite/2016053. Epub.
- Li, Y., Zhou, H. (2017) Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 18: 273-280. doi: 10.1080/14712598.2018.1413086.
- Liassides, M., Christodoulou, V., Moschandreas, J., Karagiannis, C., Mitis, G., Koliou, M., Antoniou, M. (2016) Toxoplasmosis in female high school students, pregnant women and ruminants in Cyprus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 110: 359–366. doi: 10.1093/trstmh/trw038.
- Lindsay, D. S., Collins, M. V., Mitchell, S. M., Wetch, C. N., Rosypal, A. C., Flick, G., Zajac, A. M., Lindquist, A., Dubey, J. P. (2004). Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Parasitol.*, 90: 1053–1056. doi: 10.1645/GE-296R.
- Liu, Q., Wang, Z. D., Huang, S. Y., Zhu, X. Q. (2015) Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors* (2015) 8: 292. doi: 10.1186/s13071-015-0902-6.
- Lopes, A. P., Cardoso, L., Rodrigues, M. (2008). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Vet. Parasitol.* 155: 184–189. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.05.007.
- Lopes, A. P., Dubey, J. P., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Rodrigues, M., Cardoso, L. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Vet. Parasitol.* 193: 266–269. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.001.

Lopes, A. P., Granada, S., Oliveira, A. C., Brancal, H., Dubey, J. P., Cardoso, L., Vilhena, H. (2014). Toxoplasmosis in dogs: first report of *Toxoplasma gondii* infection in any animal species in Angola. *Path. and Global Health* 108: 344-6. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000160.

Lopes, A. P., Oliveira, A., Granada, S., Rodrigues, F. T., Papadopoulos, E., Schallig, H., Dubey, J. P., Cardoso, L. (2017). Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in domestic cats from Luanda, Angola. *Vet. Parasitol.* 239: 15-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.04.009.

Lopes, A. P., Vilares, A., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Ferreira, I., Gargaté, M. J., Rodrigues, M., Cardoso, L. (2015) Genotyping Characterization of *Toxoplasma gondii* in Cattle, Sheep, Goats and Swine from the North of Portugal. *Iran J. Parasitol.:* 10: 465-472.

Lopes, A.P., Santos, H., Neto, F., Rodrigues, M., Kwok, O.C., Dubey, J.P., Cardoso, L. (2011) Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs from northeastern Portugal. *J. Parasitol.* 97: 418– 420. doi: 10.1645/GE-2691.1.

Loureiro, J. M. (2005). *Postais Antigos de S.Tomé e Príncipe*. 2ª Edição, Maisimagem – Comunicação Global, Lda. Lisboa.

MacLaren, A., Attias, M., Souza, W. (2004). Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils. *Vet. Parasitol.*, 125: 301-312. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.006.

Martínez-Flores, W. A., Palma-García, J. M., Caballero-Ortega, H., Del Viento-Camacho, A., López-Escamilla, E., Martínez-Hernández, F., Vinuesa, P., Correa, D., Maravilla, P. (2017) Genotyping *Toxoplasma gondii* with the B1 Gene in Naturally Infected Sheep from an Endemic Region in the Pacific Coast of Mexico. *Vect-Borne Zoonotic Dis.* 17: 495-502. doi: 10.1089/vbz.2016.2085.

Mickoto, R. M., Akue, J. P., Bisvigou, U., Tsonga, S. M., Nkoghe, D. (2010). Serological study on toxoplasmosis among pregnant women from Franceville, Gabon. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 103: 41-43. doi: 10.1007/s13149-009-0031-6.

Millán, J., Candela, M. G., Palomares, F., Cubero, M. J., Rodríguez, A., Barral, M., De La Fuente, J., Almería, S., León-Vizcaíno, L. (2009). Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. J. Lond. Engl.* 182: 114–124. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.04.005.

Mitchell, S. M., Zajac, A. M., Kennedy, T., Davis, W., Dubey, J. P., Lindsay, D. S. (2006). Prevention of recrudescence of toxoplasmic encephalitis using ponazuril in an immunodeficient mouse model. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53: S164–S165. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00217.x.

Montoya, J. G. (2002). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, 185: S73–S82. doi: 10.1086/338827.

Montoya, J. G., Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363: 1965-1976. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X.

Moreno, B., Collantes-Fernández, E., Villa, A., Navarro, A., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L. M. (2012) Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* 187: 312–318. doi:10.1016/j.vetpar.2011.12.034.

Morley, E. K., Williams, R. H., Hughes, J. M., Thomasson, D., Terry, R. S., Duncanson, P., Smith, J. E., Hide, G. (2008) Evidence that primary infection of Charollais sheep with *Toxoplasma gondii* may not prevent foetal infection and abortion in subsequent lambings. *Parasitol.* 135: 169–173. doi: 10.1017/S0031182007003721.

Must, K., Lassen, B., Jokelainen, P. (2015). Seroprevalence of and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Cats in Estonia. *Vect-borne and zoonotic Dis.* 15: 597-601. doi: 10.1089/vbz.2015.1809.

Neves, M. C. (2009). O poder político e as políticas económicas no período de transição em São Tomé e Príncipe: do Regime Socialista para o Regime Democrático Representativo. Florianópolis, Brasil.

Njunda, A. L., Assob, J. C., Nsagha, D. S., Kamga, H. L., Nde, P. F., Yugah, V. C. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Cameroon. *J. of Pub. Health in Africa* 2: e24. doi: 10.4081/jphia.2011.e24.

Ohioleji, J. A., Isaac, C. (2016). Toxoplasmosis in Nigeria: the story so far (1950–2016): a review. *Folia Parasitologica (Praha).* 63. pii: 2016.030. doi: 10.14411/fp.2016.030.

Onyiche, T. E., Ademola, I. O. (2015). Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in Ibadan, Nigeria. *J. Parasitol. Dis.* 39: 309-14. doi: 10.1007/s12639-013-0350-1.

Opsteegh, M., Haveman, R., Swart A. N., Mensink-Beerepoot, M. E., Hofhuis, A., Langelaar, M. F., Van Der Giessen, J. W. (2012). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 104: 317- 326. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.01.003.

Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês “The Food and Agriculture Organization”) (2017) Disponível em: <http://www.fao.org/portugal/noticias/detail/en/c/432748/>. Acesso a: 15 Julho, 2018.

Panadero, R., Paineira, A., López, C., Vázquez, L., Paz, A., Díaz, P., Dacal, V., Cienfuegos, S., Fernández, G., Lago, N., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). *Res. Vet. Sci.* 88: 111–115. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.05.010.

Petrie, A., Watson, P. (2013). *Statistics for Veterinary and Animal Science*. Blackwell, Oxford, pp243.

Pimenta, A. L., Piza, E. T., Cardoso, R. B., Dubey, J. P. (1993). Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 45: 323–326.

Quist, C. F., Dubey, J. P., Luttrell, M. P., Davidson, W. R. (1995) Toxoplasmosis in wild turkeys: a case report and serologic survey. *J. Wildl. Dis.* 31: 255–258. doi: 10.7589/0090-3558-31.2.255.

Robert-Gangneux, F., Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbio. Rev.*, 25: 264-296. doi:10.1128/CMR.05013-11.

Rodrigues, I. M., Castro, A. M., Gomes, M. B., Amaral, W. N., Avelino, M. M. (2009). Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 104: 434-440

- Rostami, A., Karanis, P., Fallahi, S. (2018). Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. Springer-Verlag GmbH Germany , 46: 303-315. doi: 10.1007/s15010-017-1111-3.
- Rostami, A., Riahi, S. M., Fakhri, Y., Saber, V., Hanifehpour, H., Valizadeh, S., Gholizadeh, M., Pouya, R. H., Gamble, H. R. (2017) The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among wild boars: a systematic review and meta-analysis. Vet. Parasitol., 244: 12-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.013.
- Sævik, B. K., Krøntveit, R. I., Eggen, K. P., Malmberg, N., Thoresen, S. I., Prestrud, K. W. (2015). *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pet cats in Norway and risk factors for seropositivity. J. of Feline Med. and Surg., 17:1049-56. doi: 10.1177/1098612X15569616.
- Santos, T. R., Costa, A. J., Toniollo, G. H., Luvizotto, M. C., Benetti, A. H., Santos, R. R., Matta, D. H., Lopes, W. D., Oliveira, J. A., Oliveira, G. P. (2009). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. Vet. Parasitol. 161: 324-326. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.017.
- Scarpelli, L., Lopes, W. D. Z., Migani, M., Bresciani, K. D. S., Costa, A. J. (2009). *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. Pesqui. Veterinária Bras. 29: 59–64. doi: 10.1590/S0100-736X2009000100009.
- Shaapan, R. M. (2016). The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. J. Parasitol. Dis. 40:1116–1129. doi: 10.1007/s12639-015-0661-5.
- Sharif, M., Gholami, S., Ziaei, H., Daryani, A., Laktarashi, B., Ziapour, S.P., Rafiei, A., Vahedi, M. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. The Vet. J., 174: 422–424. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.07.004.
- Silva, C. (2014). Segurança alimentar em São Tomé e Príncipe: Estudo de caso dos distritos de Água-Grande e Mé-Zóchi. Tese de mestrado. Instituto Superior de agronomia, Universidade de Lisboa, pp160.
- Silva, R. C., Da Silva, A. V., Langoni, H. (2007). Serological differentiation between acute and chronic stages in experimental *Toxoplasma* infection of normal and immunosuppressed rats (*Rattus norvegicus*). Int. Congress in Anim. hygiene. 13: 885-888.
- Sousa, M. (2017). “São Tomé e Príncipe como um Gateway Regional” (Estratégia para um Desenvolvimento Sustentável). Tese de doutoramento. Instituto Superior de Ciências Sociais e Políticas da Universidade de Lisboa, Universidade de Lisboa, pp322.
- Sousa, S., Thompson, G., Silva, E., Freire, L., Lopes, D., Correia da Costa, J.M., Castro, A., Carvalheira, J., Canada, N. (2009). Determination of the more adequate modified agglutination test cut-off for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in sheep. Zoonoses Pub. Health 56: 252–256. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01187.x.
- Sroka, J., Kusyk, P., Bilska-Zajac, E., Karamon, J., Dutkiewicz, J., Wójcik-Fatla, A., Zajac, V., Stojecki, K., Rózycki, M., Cencek, T. (2017) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. Folia Parasitologica 64. pii: 2017.023. doi: 10.14411/fp.2017.023.

- Tenter, A. M., Heckerroth, A. R., Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1217–1258.
- Tidy, A., Fangueiro, S., Dubey, J. P., Cardoso, L., Lopes, A. P. (2017) Seroepidemiology and risk assessment of *Toxoplasma gondii* infection in captive wild birds and mammals in two zoos in the North of Portugal. *Vet. Parasitol.*, 235: 47–52. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.01.004.
- Tonouhewa, A. B., Akpo, Y., Sessou, P., Adoligbe, C., Yessinou, E., Hounmanou, Y. G., Assogba, M. N., Youssao, I., Farougou, S. (2017). *Toxoplasma gondii* infection in meat animals from Africa: Systematic review and meta-analysis of sero-epidemiological studies. *Vet. World* 10:194-208. doi: 10.14202/vetworld.2017.194-208.
- Villard, O., Cimon, B., L'Ollivier, C., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Pelloux, H., Villena, I., Candolfi, E. (2016). Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diag. Microbio. and Infect. Dis.* 84: 22–33. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009.
- Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., Buffolano, W. (2009). Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet. Parasitol.*, 161: 1-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.019.
- Wap, H., Cardoso, R., Leitão, A., Nunes, T., Vilares, A., Gargaté, M. J., Meireles, J., Cortes, H., Ângelo, H. (2012) In vitro isolation and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats and pigeons in Lisbon, Portugal. *Vet. Parasitol.*, 187: 542–547. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.022.
- Wallon, M., Franck, J., Thulliez, P., Huissoud, C., Peyron, F., Garcia-Meric, P., Kieffer, F. (2010). Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet. Gynecol.*, 115: 727–733. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181d57b09.
- Wam, E. C., Sama, L. F., Ali, I. M., Ebile, W. A., Aghangu, L. A., Tume, C. B. (2016). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* IgG and IgM antibodies and associated risk factors in women of child-bearing age in Njinikom, NW Cameroon. *BMC Res. Notes* 9: 406. doi: 10.1186/s13104-016-2206-0.
- Wang, S., Zhao, G. W., Wang, W., Zhang, Z. C., Shen, B., Hassan, I. A., Xie, Q., Yan, R. F., Song, X. K., Xu, L. X., Li, X. R. (2015). Pathogenicity of Five Strains of *Toxoplasma gondii* from Different Animals to Chickens. *Korean J. Parasitol.*, 53: 155-162. doi: 10.3347/kjp.2015.53.2.155.
- Weiss, L. M., Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.*, 39: 895– 901. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.004.
- Wyrosdick, H. M., Schaefer, J. J. (2015). *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. *Anim. Health Res. Rev.* 16: 150–162 doi: 10.1017/S1466252315000183.
- Xiao, J., Yolken, R. H. (2015). Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol. (Oxf)*. 213: 828– 845. doi: 10.1111/apha.12458.
- Yang, Y., Feng, Y., Yao, Q., Wang, Y., Lu, Y., Liang, H., Zhu, X., Zhang, L. (2017) Seroprevalence, Isolation, Genotyping, and Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* Strains from Sheep in China. *Front Microbiol.* 8: 136. doi: 10.3389/fmicb.2017.00136.

Yekkour, F., Aubert, D., Mercier, A., Murat, J. B., Khames, M., Nguewa, P., Ait-Oudhia, K., Villena, I., Bouchene, Z. (2017). First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria. *Vet. Parasitol.*, 239: 31-36. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.04.013.

Yu, J., Xia, Z., Liu, Q., Liu, J., Ding, J., Zhang, W. (2007) Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. *Vet. Parasitol.*, 143: 79-85. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.031.

Zhou, M., Cao, S., Sevinc, F., Sevinc, M., Ceylan, O., Liu, M., Wang, G., Moumouni, P. F., Jirapattharasate, C., Suzuki, H., Nishikawa, Y., Xuan, X. (2017) Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant TgSAG2 and NcSAG1 to detect *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*-specific antibodies in domestic animals in Turkey. *J. Vet. Med. Sci.*, 78: 1877-1881. doi: 10.1292/jvms.16-0234.

ANEXO II - Autorização da Direcção de Pecuária de São Tomé e Príncipe

REPÚBLICA DEMOCRÁTICA  DE S. TOMÉ E PRÍNCIPE
(Unidade - Disciplina - Trabalho)
Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DIRECÇÃO DA PECUÁRIA

AUTORIZAÇÃO

Alfredo da Mata, Médico Veterinário e Director Geral da Pecuária e do Serviço Veterinário de S. Tomé, autoriza a aluna do mestrado integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, **Daniela Pereira** a realizar o estágio de preparação da sua tese, relacionada com as doenças parasitárias, durante o período de 14 de Agosto à 14 de Outubro de 2017.

Esta direcção promete prestar a estagiaria todo apoio necessário ao seu nível, para que o referido estágio se desenrole da melhor forma possível.

Direcção da Pecuária do Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural em S. Tomé, aos 11 de Março de 2017.-

RDSTP 
O Director
Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural
Direcção da Pecuária
Alfredo da Mata
Médico Veterinário
Fax (239 - 2) 24 454
Tel. (239 - 2) 22 386
Email-pecuaria@esttmc.net

Direcção da Pecuária (DP/MADR/2017) - Avenida Marg na 12 de Julho - ☒ C.P. 716 São Tomé
- São Tomé et Príncipe -

☎ + 239 2222.386 fax + 239 224 3959 ✉ direcaopecuaria@yahoo.com.

Direction de l'Elevage - São Tomé et Príncipe