

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

Flávia Teresa Ribeiro da Costa

Avaliação da transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em ovinos

Patos/PB
2020

**DISSERTAÇÃO
PPGCSA/UFCG**

**FLÁVIA TERESA RIBEIRO DA COSTA / AVALIAÇÃO DA
TRANSMISSÃO VERTICAL DE TOXOPLASMA GONDII EM OVINOS**

2020

FLÁVIA TERESA RIBEIRO DA COSTA

Avaliação da transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em ovinos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde animal, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência e Saúde animal.

Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela
Orientador

Patos/PB
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

C837a Costa, Flávia Teresa Ribeiro da

Avaliação da transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em ovinos / Flávia Teresa Ribeiro da Costa. – Patos, 2020.
65f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2020.

"Orientação: Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela."

Referências.

1. Cordeiros. 2. Infecção intrauterina. 3. Resposta imune. 4. RIFI.
5. Toxoplasmose. I. Título.

CDU 614: 619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

FLÁVIA TERESA RIBEIRO DA COSTA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Saúde Animal.

APROVADO EM: 18/02/2020

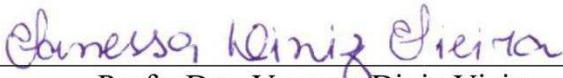
EXAMINADORES:



Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia/IFPB
Presidente (Orientador)



Prof. Dra. Carolina de Sousa Américo Batista Santos
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Membro Externo



Prof. Dra. Vanessa Diniz Vieira
Centro Universitário de Patos/UNIFIP
Membro Externo

Com todo o meu amor e gratidão, dedico este trabalho a minha mãe Wânia, meus pais Otávio e Antônio Carlos e aos meus avós Jair e Therezinha “*in memoriam*”, por serem meu porto seguro e minha fonte inesgotável de amor, compreensão, força e apoio, sem os quais eu jamais teria conseguido realizar este sonho.

Vocês são a minha âncora!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade ao me permitir o dom da vida. Agradeço também pela dádiva de ser Médica Veterinária, tendo em meu coração imenso amor e o respeito aos animais. Mesmo sem que eu mereça, posso sentir o cuidado, o amor, a graça e a misericórdia de Deus todos os dias.

A minha mãe Wânia, por ter abdicado tantos sonhos em favor dos meus, por enxergar em mim qualidades muito além do que sou capaz, por ser minha melhor amiga e conselheira, por todo o esforço e trabalho dedicado para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Espero ser digna do seu orgulho e admiração, me tornando a cada dia uma pessoa e profissional melhor. Te amo mais que tudo, a senhora é a vida da minha vida!

Ao meu pai Otávio, por sempre me incentivar a ser alguém melhor, investindo muito além do que mereço nesse sonho que sonhamos juntos, por acreditar e nunca desistir de mim. Que um dia eu seja capaz de recompensar todo o amor, toda a atenção e tudo o que senhor fez/faz por mim. Obrigada pela família que meu deu e pela minha irmã Katharina, sempre quis uma irmã que fosse do jeitinho dela. Amo você, pai!

Ao meu pai Antônio Carlos, que mesmo distante fisicamente fez o possível para que este sonho fosse real, me incentivando a nunca desistir, orando por mim de forma incansável e sempre acreditando no meu potencial. Obrigada por todo o amor, por todas as orações e por estar comigo nos momentos difíceis mesmo com a distância. Te amo, papai!

Aos meus doces avós Jair e Therezinha “*in memorian*”, sei o quanto torceram para que esse sonho fosse real, sei o quanto investiram em mim e me dedicaram amor infinito. Obrigada pelas tartarugas, peixes, passarinhos, galinhas, codornas, pintinhos coloridos, caranguejos, gatos e cães que me deixaram ter no seu quintal, assim plantaram em meu coração o amor que vocês tinham pelos animais. Vocês me ensinaram a amar... Como eu amo vocês! Onde quer que estejam essa conquista é para vocês, papai e mamãe!

Ao meu vovozinho Octávio, por sempre se preocupar com a minha educação, por investir no meu sonho e por todo o amor a mim dedicado. Te amo meu velhinho!

A minha família Ribeiro, em especial meus tios Cláudio, Flávio, Cátia e Gina, e meus primos: Rodolfo, Izadora, Lidiane, Bruno, Lila, Marcella, Raquel e Pedro. Vocês são presentes de Deus na minha vida. Amor é pouco diante do que sinto por vocês. Ohana!

A minha amiga, irmã, cúmplice, parceira, confidente, braço direito, adjetivos me faltam para alguém tão importante e especial. Denise Nogueira, muito obrigada por TUDO, sem a sua amizade e o seu apoio, sem dúvida eu não chegaria ao final. Desculpe os “perrengues” que te fiz passar no meu projeto, obrigada por estar comigo nos piores momentos, sempre de forma positiva me mostrando que haveria uma solução. Você é o reflexo do amor e do cuidado de Deus por mim, não tenho palavras para agradecer e nem sei como retribuir, mas peço que Deus continue enchendo sua vida de graça e permitindo que você continue sendo luz na vida das pessoas. Amo você demais!

A minha amiga, também irmã, confidente, exemplo de determinação e tantos outros incontáveis adjetivos, Camila Bezerra. Obrigada pela amizade, pelo ombro amigo de todos os dias independente se fossem bons ou ruins e por me ensinar a ter leveza ao encarar os momentos difíceis. Você nem imagina o quanto te admiro, a sua forma de enfrentar a vida e os desafios me inspira e impulsiona! Mesmo com a distância, você sempre se fez presente, como sou grata por isso! Sem seu apoio eu jamais teria conseguido. Amo muito você!

Denise e Camila, vocês foram o maior presente que a pós me deu! Seremos para sempre uma família! A *Sweet home* sempre existirá independente de um local físico, nossos corações sempre serão o doce lar um da outra!

As minhas amigas, parceiras, confidentes e irmãs, Beatriz Leão, Carolina Fernandez e Juliana Monteiro, por terem participado desse sonho desde o começo e fazerem com que a distância fosse apenas um detalhe diante do amor e da amizade que construímos.

Aos meus amigos Daniel Moreira, Ellyelson Américo e Rúbia Torres, obrigada pela amizade e por estarem ao meu lado independente da distância!

As amigas Brunna, Paula, Vitória, Amanda, Gisele, Draenne, Ana Clara e Ana Lucélia, por todas as palavras de apoio, por toda a amizade e carinho. Vocês são especiais!

Aos presentes que a Cidade Sorriso (Sousa-PB) me deu: Isabelle, Felipe, Dayara, Júnior, Erli, Érika e meus sobrinhos do coração: Netinho, Mariana e meus caçulinhas, José Pedro e Maria Alice. Obrigada pela linda amizade que construímos. Obrigada pelo cuidado, pela preocupação e pelo apoio! Vocês são demais!

Aos funcionários e Amigos do Instituto Federal da Paraíba, Luizinho “*in memoriam*” Professor Eduardo Beltrão, Gilvan Duarte, Sr. Otacílio (Tatá), Sr. Pedro,

Francimário, Sr. Walter, Sr. Freitas, Sr. Neto Vaqueiro, Elisângela e Eliana, meu eterno respeito, admiração, carinho e gratidão. Vocês foram fundamentais para essa conquista!

Ao amigo e incontáveis vezes verdadeiro professor, Michel. Se eu passasse o resto da vida agradecendo, ainda não seria o suficiente. Você é doutor em humildade, generosidade e amizade!

Aos proprietários dos ovinos que compuseram a minha pesquisa: Dona Poliana, Dona Nem, Sr. Raimundo, Sr. Avaneto, Sr. Manoel, Sr. Francisco, Francimário, Thiago, Pingo e a família Casé, por terem sido sempre solícitos, pela confiança em mim e no meu trabalho.

Aos animais que deram seu sangue, seu tempo e sua tolerância, para a realização desta pesquisa. Espero a cada dia ser melhor para vocês e todas as outras espécies que necessitarem do meu cuidado.

Aos meus queridos “estagiários”, para mim foram mais que isso, foram amigos. Andressa, Emilly, Samara, Rayanne, Tielle, Juliana, Larissa, Eduarda, Marcos “*in memoriam*”, Wllysse, Rômulo, Felipe, Aldo, Danilo, Roberto e Emerson. Esse trabalho é nosso! Vocês foram fundamentais para que ele se concretizasse! Espero poder retribuir de alguma forma todo o comprometimento e apoio de vocês comigo e com a nossa pesquisa.

Aos professores, Silvano Higino, Clebert Alves, Sérgio Azevedo e Dona Francinete por terem me acolhido no Laboratório de Doenças Transmissíveis, por toda a ajuda nos exames realizados e pela disponibilidade em oferecer o que fosse necessário para que a pesquisa acontecesse. Minha sincera gratidão!

Aos meus orientadores, Vinícius Longo Ribeiro Vilela e Thais Ferreira Feitosa. Obrigada por me mostrarem o caminho da pesquisa e da ciência, me ensinando a dar os primeiros passos nesse árduo, porém recompensador trajeto. Obrigada pelo desafio imposto, com ele descobri uma força que jamais pensei que tivesse.

A pós-graduação em Ciência e Saúde animal da Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo investimento nesta pesquisa através da concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a concretização dessa etapa tão importante da minha vida. Meus mais sinceros agradecimentos!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário do Filo Apicomplexa, tendo como principal hospedeiro definitivo o gato doméstico (*Felis catus domesticus*). Conhecido como um dos agentes de maior sucesso biológico entre os parasitas, apresenta capacidade de infectar mais de 200 espécies diferentes, além de ser o responsável por causar uma das zoonoses de maior impacto já descritas na literatura e pela ocorrência de graves distúrbios reprodutivos nos animais domésticos, com destaque nos ovinos. Esta dissertação é formada por dois capítulos: o Capítulo I intitulado Avaliação da transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos naturalmente infectados no semiárido do Brasil. Neste artigo buscou-se avaliar a transmissão vertical, através da presença de Imunoglobulina G (IgG) de *T. gondii* em ovinos naturalmente infectados. Foram acompanhadas 55 matrizes ovinas, destas 54,5% (30/55) demonstraram positividade na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). As matrizes geraram 41 filhotes (58,6%) provenientes de mães positivas e 29 filhotes (41,4%) de mães negativas. A taxa de transmissão vertical foi de 13,3% (4/30) dos partos ocorridos de ovelhas soropositivas, dentre estes um dos cordeiros soropositivos apresentou titulação de 16.384 sendo a maior encontrada neste estudo. Os títulos das mães que geraram filhotes soropositivos, variaram de 128 a 8.192 e não foi observada transmissão quando as mães apresentaram titulação de 64. A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em conceptos indicou que a transmissão vertical é uma importante via de transferência e manutenção de agente em rebanhos ovinos no semiárido brasileiro. No Capítulo II intitulado Revisão sistemática e metanálise da taxa de transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos, objetivou-se realizar uma revisão sistemática com meta análise para avaliar a taxa de transmissão vertical de *T.gondii* em ovinos. Foram identificados nove trabalhos que envolviam estudos de infecção natural e experimental. Seis dos nove estudos utilizaram o Teste Indireto de Anticorpo Imunofluorescente (IFAT) para realização do diagnóstico. A maioria utilizou duas ou mais técnicas para obtenção dos resultados. Por meio da metanálise, foi encontrada elevada taxa de transmissão vertical de 66%. A significativa heterogeneidade encontrada relaciona-se aos diferentes delineamentos das pesquisas e a falta de padronização dos métodos de diagnóstico, demonstrando a necessidade de realização de novos trabalhos direcionados a transmissão vertical em ovinos e a padronização diagnóstica. Estes resultados revelam que a transmissão vertical é uma importante rota de transmissão do agente. Desse modo, mais estudos que envolvam esta temática esclarecendo aspectos que ainda não se encontram aclarados na literatura, mostram-se necessários.

PALAVRAS-CHAVE: Cordeiros; Infecção intrauterina; Resposta imune; RIFI; Toxoplasmose.

ABSTRACT

The *Toxoplasma gondii* is a protozoan of the Apicomplexa Phylum, having the domestic cat (*Felis catus domesticus*) as its main definitive host. Known as one of the most biologically successful agents among parasites, it has the capacity to infect more than 200 different species, in addition to being responsible for causing one of the most impacting zoonoses already described in the literature and for the occurrence of serious reproductive disorders in domestic animals, especially in sheep. This dissertation consists of two chapters: Chapter I entitled Evaluation of vertical transmission of *T. gondii* in sheep naturally infected in the semiarid region of Brazil. In this article, we sought to evaluate vertical transmission, through the presence of *T. gondii* Immunoglobulin G (IgG) in naturally infected sheep, 55 sheep matrices were monitored, of which 54.5% (30/55) demonstrated positivity in the Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI). The mothers generated 41 puppies (58.6%) from positive mothers and 29 puppies (41.4%) from negative mothers. The rate of vertical transmission was 13.3% (4/30) of the deliveries of seropositive sheep, among which one of the seropositive lambs had a titre of 16,384, the highest being found in this study. The titers of mothers who generated seropositive puppies ranged from 128 to 8,192 and no transmission was observed when the mothers had a titration of 64. Detection of anti-*T. gondii* antibodies in conceptos indicated that vertical transmission is an important means of transferring and maintaining agents in sheep herds in the Brazilian semiarid region. In Chapter II entitled Systematic review and meta-analysis of the rate of vertical transmission of *T. gondii* in sheep, the objective was to carry out a systematic review with a meta-analysis to assess the rate of vertical transmission of *T. gondii* in sheep. Nine studies were identified that involved studies of natural and experimental infection. Six of the nine studies used the Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) to make the diagnosis. Most used two or more techniques to obtain the results. Through meta-analysis, a high rate of vertical transmission of 66% was found. The significant heterogeneity found is related to the different designs of the research and the lack of standardization of diagnostic methods, demonstrating the need to carry out new works aimed at vertical transmission in sheep and diagnostic standardization. These results reveal that vertical transmission is an important agent transmission route. Thus, more studies involving this theme clarifying aspects that are not yet clarified in the literature, are necessary.

KEY-WORDS: Lambs; Intrauterine infection, Immune response, RIFI, Toxoplasmosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Representação geográfica das propriedades ovinas analisadas para compor a pesquisa, localizadas no semiárido do Brasil.....43
- Gráfico I.** Relação dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos filhotes de ovelhas positivas antes da ingestão do colostro (●) e das ovelhas positivas (▲).....45
- Gráfico II.** Relação dos títulos de anticorpos de ovelhas positivas (●) e dos seus filhotes 48h após a ingestão do colostro (▲).....46
- Gráfico III.** Relação dos níveis de anticorpos dos animais positivos com a progressão da infecção (dias).....47

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Fluxograma do processo de busca, seleção e inclusão dos estudos na revisão sistemática.....62
- Figura 2.** Combinação dos dez estudos de acordo com o resultado da taxa de transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos.....63
- Figura 3.** Gráfico de funil apresentando a distribuição assimétrica dos estudos de taxa de transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos.....63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Distribuição numérica dos títulos de anticorpos das ovelhas que apresentaram IgG contra *Toxoplasma gondii* e a relação com a ocorrência da transmissão vertical. **43**

Tabela 2 Titulação das ovelhas positivas para anticorpos anti. *T. gondii* e acompanhamento sorológico de suas respectivas crias até os 56 dias de vida. **44**

CAPÍTULO II

Tabela 1. Síntese das principais características dos estudos de transmissão vertical em ovinos. **64**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
HAI	Hemaglutinação Indireta
HAI 2-ME	Hemaglutinação indireta 2-Mercaptoetanol
IFAT	Teste Indireto de Imunofluorescência
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
Kg	Quilograma
MAT	Técnica de Soroaglutinação Microscópica
mL	Mililitro
mm	Milímetro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNECBT	Programa Nacional de Erradicação e Controle da Brucelose e Tuberculose Animal
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
sp	Espécie
TH1	T Helper 1
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
WB	Western Blot

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
%	Porcentagem
≥	Maior ou Igual

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO GERAL.....	18
REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO I.....	24
Transmissão vertical de <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos naturalmente infectados no semiárido do Brasil.....	25
RESUMO.....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e Métodos.....	27
2.1. Área de estudo.....	27
2.2. Animais utilizados no estudo e composição dos grupos.....	28
2.3. Diagnóstico sorológico em matrizes e cordeiros.....	29
2.4. Avaliação da transmissão vertical.....	29
2.5. Análise estatística.....	29
3. Resultados.....	30
4. Discussão.....	32
5. Conclusões.....	36
Contribuição dos autores.....	36
Declaração de interesse concorrente.....	36
Referências.....	37
CAPÍTULO II.....	48
Revisão sistemática e metanálise da taxa de transmissão vertical de <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos.....	49
Resumo.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
Desenho da pesquisa.....	51
Elegibilidade dos artigos.....	51
Fontes de informação e estratégias de busca.....	52
Seleção dos estudos e extração dos dados.....	52
Análise dos dados.....	52
Resultados.....	53
Discussão.....	54
Conclusão.....	57
Referências bibliográficas.....	58
Conclusão geral.....	65

INTRODUÇÃO GERAL

A ovinocultura no Brasil apresenta grande potencial expensor, principalmente quando relacionada ao agronegócio, onde é possível observar um crescente aumento no número de criadores interessados em investimentos no setor (NOGUEIRA et al., 2011).

O forte interesse se justifica ao analisar que este sistema de criação possui muitas vertentes no que se associa a gama de produtos e subprodutos de qualidade como carne, leite, pele e lã que garantem o aproveitamento quase completo do animal e significativa geração de renda. Além do fator econômico relacionado a criação de ovinos, é considerada uma atividade de grande papel social para as populações rurais, pois é através dela que advém o trabalho e o sustento de muitas famílias (VIANNA, 2008).

O rebanho ovino brasileiro possui cerca de 18 milhões de cabeças distribuídas em todas as regiões do país, sendo concentrada a maior parte desse oviário na região Nordeste contendo cerca de 64,2%. O Estado da Paraíba calcula ter um rebanho ovino estimado em 572.688 animais, distribuídos em 19.826 latifúndios inseridos em maior parte na zona semiárida (IBGE, 2017). Avalia-se que os rebanhos têm em média 50 animais, representados em maioria pelas raças Santa Inês, Dorper e mestiços, conhecidos pela sua adaptabilidade e rusticidade (LEITE; SIMPLÍCIO, 2005).

Apesar do aumento da criação de ovinos, fatores atrelados a nutrição, reprodução e manejo sanitário podem influenciar na diminuição da produção, uma vez que estão intimamente associadas as fases de desenvolvimento dos animais (RISSI et al., 2010). Em meio aos principais fatores que implicam na produção e prolificidade, a eficiência reprodutiva é um dos primordiais. Dentre as enfermidades que afetam a reprodução, destaca-se a toxoplasmose que representa causa importante de falha reprodutiva em ovinos, relacionada a abortamentos, natimortos e nascimento de crias fracas, além de assumir um papel epidemiológico de destaque na saúde pública, por se tratar de uma doença com potencial zoonótico (PINHEIRO et al., 2000; SELEEM et al., 2010; CHIEBAO, 2015).

A toxoplasmose é uma doença de distribuição mundial causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário do Filo apicomplexa capaz de parasitar o homem, animais domésticos e silvestres, como hospedeiros intermediários e apenas os membros da Família Felidae, constituída por felinos domésticos e selvagens, como hospedeiros definitivos.

Os animais podem se infectar pelo *T. gondii* através das consecutivas formas primárias: ingestão de oocistos esporulados ao consumir alimentos e água contaminados, ingestão de tecidos de animais contendo cistos infectantes e por transmissão transplacentária (DUBEY; BEATTIE, 1988; MARTINS; VIANA, 1998).

O *T. gondii* foi descrito na espécie ovina pela primeira vez em 1942 (NICOLLE; MANCEAUX 1969), e desde essa época muitos trabalhos destacam a importância da toxoplasmose nos ovinos como causa de abortos e outros problemas relacionados à reprodução.

Os ovinos naturalmente se infectam com oocistos esporulados disponíveis no ambiente (DUBEY; SHARMA, 1980). Em uma fêmea prenhe, o parasito infecta a placenta, parasitando as carúnculas maternas nos placentomas e alcançando as células trofoblásticas fetais adjacentes, caracterizando a transmissão transplacentária (BUXTON, 1990).

As principais lesões descritas em placenta de ovinos são inflamações focais que frequentemente evoluem para necrose dos cotilédones fetais em diferentes graus. Os focos de lesão podem ser pequenos e esparsos com pontos esbranquiçados e espalhados, ou nódulos maiores de até 2 mm de diâmetro (BERVERLEY et al., 1971). Tais lesões podem ser encontradas em até metade dos casos de toxoplasmose (PESCADOR et al., 2007).

Alguns estudos que revelam a elevada frequência de ocorrência de transmissão vertical em ovinos tem sido motivo de críticas quanto à forma com que este evento vem sendo esclarecido, baseando-se apenas em resultados de diagnósticos moleculares e sem evidências de lesões histopatológicas, de conversão sorológica ou isolamento do agente (BUXTON et al., 2007; INNES et al., 2009).

A grande maioria dos estudos publicados relacionados o *T. gondii* como importante causador de enfermidades relacionadas a danos reprodutivas foram realizados de forma experimental. Segundo Azevedo Filho et al. (2017), estudos de observação da dinâmica natural das infecções são de extrema importância, por mostrarem sem interferência os reais parâmetros relacionados a capacidade de virulência do protozoário, o estágio da gestação e a dose capaz de promover a infecção.

Pelo exposto, pesquisas que apontem a possibilidade da ocorrência de agentes por outras vias além das comumente conhecidas e de forma natural, se mostram de extrema importância para que se adotem adequadas medidas de sanidade e controle.

Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar a transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em ovinos.

Esta dissertação constitui-se em dois capítulos: o Capítulo I consiste em uma avaliação da transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos naturalmente infectados no semiárido do Brasil; o referido artigo será submetido ao periódico *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* (JCR 1.871, Qualis A1). O Capítulo II fundamenta-se acerca de uma revisão sistemática com metanálise da taxa de transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos e será submetido ao periódico *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology / Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* (JCR 1.013, Qualis A2).

REFERÊNCIAS

AZEVEDO FILHO, P.C.G.; OLIVEIRA, J.M.B.; ANDRADE, M.R.; SILVA, J.G.; KIM, P.C.P.; ALMEIDA, J.C.; PORTO, W.J.N.; MOTA, R.A. Incidence and vertical transmission rate of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 52, 2017, p. 19-22.

BERVERLEY, J.K.A.; WATSON, W.A.; SPENCE, J.B. The pathology of the foetus in ovine abortion due to toxoplasmosis. **Veterinary Record**, v.88, 1971, p. 174-178.

BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, 1990, p. 509-511.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v.149, 2007, p.25-28.

CHIEBAO, D.P. Estudo da infecção oral por *Toxoplasma gondii* em ovinos: avaliação da transmissão congênita em infecções experimentais por meio de diferentes linhagens brasileiras. 12-14f. (Tese - **Doutorado em Ciências**) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Sanidade Animal. São Paulo, 2015.

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

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Parasitaemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 111-114, 1980.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática. Banco de Dados Agregados**. Tabela 3939: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/73#resultado>. Acesso em: 10 jan. 2020.

INNES, E.A.; BARTLEY, P.M.; BUXTON, D.; KATZER, F. Ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 136, 2009, p. 1887-1894.

LEITE, E.R.; SIMPLÍCIO, A.A. **Sistema de produção de caprinos e ovinos de corte para o Nordeste brasileiro: Importância econômica**, 2005. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br/importancia.htm>. Acesso em: 10 jan. 2020.

MARTINS C.S.; VIANA J.A. Toxoplasmose – o que todo profissional de saúde deve saber. **Clínica Veterinária**, v.3, n.15, 1998, p.7-33.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C. R. Seances Academie Sciences**, v.148, 1969, p.369-372.

NOGUEIRA, A.H.C.; CHIEBAO, D.P.; VILLALOBOS, E.C.M. Sanidade na Ovinocultura. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, n.24, 2011, p.86.

PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; PEDROSO, P.M.O.; BANDARRA, P.M.; OKUDA, L.H.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, 2007, p.167-171.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, 2000, p.534-543.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA FILHO, J.C.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul: 361 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, 2010, p.21-28.

SELEEM, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, 2010, p.392-398.

VIANNA, J.G.A. Governança da cadeia produtiva da ovinocultura do Rio Grand do Sul: estudo de caso à luz dos custos de transação e produção. 137f. (**Dissertação-Mestrado em extensão rural**). Centro de Ciências rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

CAPÍTULO I:

Transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em ovinos naturalmente infectados no semiárido do Brasil

Flávia T. R. Costa *, Denise B. Nogueira, Maria A. G. Oliveira, Samara S. Silva, Rômulo F. Silva, Wlysse F. Sarmiento, Arthur W. L. Brasil, Sérgio S. Azevedo, Solange M. Gennari, Hilda F. J. Pena, Thais F. Feitosa*, Vinícius L. R. Vilela.

(Artigo à ser submetido ao periódico: *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, Qualis A1, Fator de impacto 1.871)

Transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em ovinos naturalmente infectados no semiárido do Brasil

Flávia T. R. Costa¹, Denise B. Nogueira², Maria A. G. Oliveira¹, Samara S. Silva¹, Rômulo F. Silva¹, Wlysse F. Sarmiento¹, Sérgio S. Azevedo², Solange M. Gennari³, Hilda F. J. Pena³, Arthur W. L. Brasil⁴, Vinícius L. R. Vilela¹, Thais F. Feitosa^{1*}

¹Laboratório de Imunologia e Doenças Infectocontagiosas, Instituto Federal da Paraíba, Sousa, Brasil.

²Laboratório de Doenças Transmissíveis, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

* Corresponding author. E-mail address: vinicius.vilela@ifpb.edu.br (V. L. R. Vilela).

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito cosmopolita com capacidade de infectar o sistema reprodutivo de ovinos. Alguns aspectos da transmissão vertical não estão totalmente elucidados. Dessa forma este estudo avaliou a transmissão transplacentária do *T. gondii* em ovinos naturalmente infectados. Foram selecionadas 55 matrizes para monitoramento dos níveis de IgG anti-*T. gondii*, pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). 54,5% (30/55) das matrizes foram soropositivas e estas geraram 41 (58,6%) filhotes, enquanto que as matrizes negativas geraram 29 (41,4%) cordeiros. A taxa de transmissão vertical foi de 13,3% (4/30) dos partos ocorridos de ovelhas soropositivas. Os títulos das mães que geraram filhotes soropositivos, variaram de 128 a 8.192 e não foi observada transmissão quando as mães apresentaram titulação de 64. A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em conceptos indica que a transmissão vertical é

uma importante via de transferência e manutenção de agente em rebanhos ovinos no semiárido brasileiro.

Palavras-chave: Cordeiros, Infecção intrauterina, Resposta imune, RIFI, Toxoplasmose.

1. Introdução

A investigação epidemiológica das doenças infecciosas e parasitárias do ciclo reprodutivos em ovinos é uma ferramenta necessária no planejamento de medidas preventivas e sanitárias, a fim de evitar perdas econômicas no rebanho. Neste contexto, as infecções que tradicionalmente fazem parte do manejo sanitário reúnem-se a enfermidades emergentes, dentre as quais destaca-se a toxoplasmose [1].

A toxoplasmose é uma enfermidade cosmopolita, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que acomete o homem, animais domésticos e selvagens. Os felinos domésticos e silvestres são os hospedeiros definitivos, sendo o gato (*Felis catus domesticus*) o principal. Os hospedeiros suscetíveis podem se infectar por *T. gondii* por meio das seguintes formas primárias: transmissão transplacentária, ingestão de tecidos de animais contendo cistos infectantes e ingestão de água e alimentos contaminados com fezes de gatos contendo oocistos esporulados [2].

Em diversas partes do mundo existem estudos relatando as perdas reprodutivas causadas pelo *T. gondii* [3,4]. No Brasil, são raros os estudos sobre a contribuição de *T. gondii* para o aborto espontâneo e o óbito fetal em ovinos. Existem pesquisas pontuais sobre surtos, como um estudo realizado no estado de Pernambuco onde encontraram 14,3% (5/35) de fetos de ovinos positivos para *T. gondii* por meio da análise da placenta

e de órgãos fetais através de Reação em cadeia da Polimerase - PCR e exame histopatológico[5]. Já no Estado de Minas Gerais, foi acompanhado um rebanho com 100 fêmeas ovinas no último mês de gestação, uma taxa de aborto de 40%, onde foi possível diagnosticar *T. gondii* na placenta das fêmeas e nos órgãos dos fetos, através de histopatologia, imunohistoquímica e PCR [6].

A transmissão transplacentária pode ser classificada em duas formas, exógena e endógena. A transmissão exógena ocorre quando a fêmea é infectada durante a prenhez e o parasita atravessa a placenta infectando o feto. Já a transmissão endógena, é o resultado da reativação de uma infecção crônica, persistente no animal e durante a gravidez ocorre a reativação do parasita que atravessa a placenta e infecta sua prole [7].

Em ruminantes, inclusive os ovinos, a placenta é do tipo sindesmocorial, o que impede a passagem de proteínas séricas, como as Imunoglobulinas. Portanto, a imunidade humoral adquirida passivamente em ovinos ocorre via colostro e não pela transferência transplacentária de anticorpos [8]. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a transmissão vertical de *T. gondii*, através da detecção de anticorpos Imunoglobulina G (IgG) em ovinos recém-nascidos antes destes ingerirem o colostro, sendo possível demonstrar que o presente método se apresenta de maneira simples e eficiente para a detecção de infecções congênicas.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

O experimento foi realizado no setor de Ovinocultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), campus Sousa, Brasil (6°50'17.8"S, 38°17'43.2"W). Foram utilizadas duas baias, localizadas ao ar livre, contendo áreas de

sombreamento natural compostas por vegetação pré-existente no local, além de um sombreamento artificial composto por lona plástica, para proteger os animais de alterações climáticas como chuvas e correntes de ar forte. Cada baía possuía capacidade para abrigar 15 animais, garantindo aproximadamente três m² por animal. As matrizes ovinas positivas, foram transferidas de suas propriedades de origem ao setor no estágio final da gestação e a maioria permaneceu no local até a oitava semana pós-parto, para que fossem realizadas coletas semanais de sua progênie.

2.2. Animais utilizados no estudo e composição dos grupos

A referida pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IFPB, protocolo nº 01.0462.2017.

Foram selecionadas 55 matrizes ovinas múltiparas, mestiças de Dorper e Santa Inês, provenientes de propriedades inseridas no semiárido paraibano (Fig. 1). Todas as fêmeas, foram testadas antes da gestação para *T. gondii* e independente do resultado, no terço final da gestação foram encaminhadas ao setor de Ovinocultura do IFPB para acompanhamento do parto. Para isso, as ovelhas foram acompanhadas e monitoradas visualmente a cada 60 minutos, 24 horas por dia, até o parto, e, imediatamente após o nascimento dos cordeiros, antes da ingestão do colostro, foram coletados 5ml sangue desses filhotes por venopunção jugular. Após a ingestão do colostro, amostras de sangue de 25 cordeiros foram coletadas com 48h, sete, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias, para acompanhamento da dinâmica de anticorpos.

As matrizes foram testadas sorologicamente para *T. gondii* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em seguida, divididas em dois grupos, G1 (matrizes positivas) e G2 (matrizes negativas). O G1 foi composto por 30 animais e o G2 por 25.

Cada grupo permaneceu isolado em sistema de confinamento, recebendo alimentação volumosa e concentrada em cocho, além de água à vontade e suplementação mineral.

2.3. Diagnóstico sorológico em matrizes e cordeiros

Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* nas matrizes e cordeiros, empregou-se a técnica da RIFI, utilizando-se anti-IgG-ovina conjugado a isotiocianato de fluoresceína (molécula inteira, SIGMA, St. Louis, MO, EUA) [9]. Foram considerados positivos aqueles soros que reagiram nas diluições maiores ou iguais a 1:64 e os positivos foram submetidos a diluições sequenciais na base dois até a negatificação [10]. Todos os cordeiros foram monitorados clinicamente, através de exame físico e parasitológico de fezes, como forma de manejo sanitário. Foi realizado diagnóstico diferencial das amostras para *Leptospira* sp. pela Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT), a partir de uma coleção de 24 sorogrupos patogênicos, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) [11] e *Brucella abortus* por meio do teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), recomendado pelo Programa Nacional de Erradicação e Controle da Brucelose e Tuberculose animal (PNECBT) [12].

2.4. Avaliação da transmissão vertical

Os cordeiros foram considerados positivos para transmissão vertical quando apresentaram através da RIFI, titulação ≥ 64 de anticorpos anti-*T. gondii* na colheita pré-colostral [13].

2.5. Análise estatística

Os valores observados nas titulações foram inseridos em uma planilha. Posteriormente as variáveis “título de anticorpos de ovelhas x título de anticorpos de cordeiros 48 horas após a ingestão de colostro” e “título de anticorpos de ovelhas positivas com cordeiros positivos antes de ingerir o colostro x títulos de anticorpos de cordeiros positivos antes de ingestão de colostro” foram submetidos a um teste de correlação de Spermán. As análises foram realizadas no aplicativo SPSS 23 *for* Mac ao nível de significância de 5%.

3. Resultados

Todos os cordeiros nasceram clinicamente saudáveis, pesando entre 2 e 3 kg ao nascimento. Das 55 ovelhas, 54,5% (30/55) foram positivas na RIFI. Durante o experimento, as matrizes analisadas geraram 70 filhotes, sendo 41 (58,6%) provenientes de mães positivas e 29 (41,4%) gerados de mães negativas.

Observou-se transmissão vertical em 13,3% (4/30) dos partos ocorridos de mães positivas. A titulação das mães que tiveram filhotes infectados via transplacentária variou de 128 a 8.192 e a titulação de três dos quatro animais positivos antes da ingestão do colostro foi igual ou superior a de suas mães (Gráfico I). Não foi observada transmissão quando as mães apresentaram titulação de 64 (Tabela 1).

As variáveis referentes ao “título de anticorpos de ovelhas x título de anticorpos de cordeiros 48 horas após a ingestão de colostro” (Coeficiente de correlação 0.294 $p=0.062$) e, “título de anticorpos de ovelhas positivas com cordeiros positivos antes de ingerir o colostro x títulos de anticorpos de cordeiros positivos antes de ingestão de colostro” (Coeficiente de correlação 0.500 $p=0.500$) que foram submetidas a análise de

correlação, apresentaram coeficiente fraco e moderado, respectivamente e não apresentaram correlação significativa entre os grupos.

Os cordeiros que nasceram infectados apresentaram titulação variando de 64 a 8.192 na coleta pré-colostral (Tabela 2). Esses animais, na segunda coleta, 48h após o nascimento, apresentaram títulos superiores aos pré-colostrais, chegando até 16.384. Todos os animais positivos para transmissão vertical nasceram de partos únicos. Nenhuma das 29 crias provenientes de 25 matrizes negativas foram positivas na coleta pré-colostral e também não foram observados abortos nas fêmeas avaliadas.

Observou-se que 48,8% (20/ 41) dos animais nascidos de mães positivas apresentaram anticorpos colostrais anti *T. gondii* em 48h após o nascimento, excluindo os animais que se infectaram via transplacentária (Gráfico II). Foi visto ainda que quanto maior a titulação da mãe, maior a possibilidade dos anticorpos anti *T. gondii* adquiridos através do colostro sejam detectados no sangue dos cordeiros 48h após o nascimento.

Foram acompanhados 16 animais filhos de mães positivas do nascimento aos 56 dias de vida, no qual foi possível verificar que os títulos de anticorpos diminuía a cada semana e que apenas dois animais permaneceram com títulos colostrais detectáveis até a última coleta (Gráfico III). Também foram acompanhados nove animais, filhos de mães negativas, do nascimento aos 56 dias de vida e nenhum animal se tornou positivo durante as coletas do experimento.

Notou-se que 11 matrizes positivas com titulações variantes de 64 a 1.024 geraram cordeiros negativos, e a maior parte deles foram acompanhados apenas até 48h pós nascimento. A maioria dos animais negativos eram nascidos de fêmeas com títulos de 64 e cinco das gestações destas fêmeas deram origem a conceptos gemelares.

Para excluir a possibilidade de ocorrência de outros agentes causadores de alterações reprodutivas, foi realizado diagnóstico diferencial para *Leptospira* sp. e *Brucella Abortus* e todos os animais do experimento apresentaram resultados negativos em ambos os testes.

4. Discussão

Toxoplasma gondii pode ser um importante causador de aborto em pequenos ruminantes, estando diretamente associado à diminuição dos números de nascimentos ou até mesmo com o nascimento de crias fracas que morrem logo após o parto. Em uma pesquisa realizada em cabras, observou-se que as fêmeas negativas tendem a ter mais filhos que as positivas [14]. Entretanto neste trabalho, não foram observadas diferenças entre as taxas de partições de mães negativas e positivas.

Diferentemente das pesquisas mais recentes, que corroboram com os resultados do presente trabalho, pesquisadores chegaram a afirmar que a recrudescência de uma infecção endógena não seria uma rota importante para infecção por *T. gondii* em ovinos (Dubey e Beattie, 1988; Buxton e Rodger, 2008). Porém, o presente trabalho sugere que a transmissão transplacentária endógena é comum em ovelhas cronicamente infectadas. Em pesquisa realizada com infecção experimental de ovelhas, antes da gestação, utilizando a cepa ME49 foi visto que os cordeiros nascidos foram positivos através da sorologia e da PCR [15]. Em outro estudo realizado na França, observaram através da PCR de tecidos dos filhotes, a ocorrência de 31 % de cordeiros infectados provenientes de gestações sucessivas de ovelhas cronicamente infectadas [16]. Pesquisadores avaliaram, no Brasil, a transmissão congênita em ovelhas cronicamente infectadas, após reinfeção experimental por *T. gondii* e verificaram que dois em cada três cordeiros

sofreram transmissão vertical [13]. Deste modo, pode-se inferir que a imunidade vitalícia para *T. gondii* não é adquirida após uma infecção primária.

Os fatores que levam à infecção transplacentária endógena por *T. gondii* em gestantes cronicamente infectadas é complexo. Durante a gestação, a fêmea apresenta uma diminuição na resposta imune celular mediada por linfócitos Th1, células importantes para a imunidade contra microrganismos intracelulares. Além disso, outras citocinas, como o IFN- γ , que são cruciais para a ativação de macrófagos, neutrófilos e células Natural Killer também estão suprimidas devido a toxicidade que causam à placenta [8,17]. Foi descrito após um experimento a importância do IFN- γ e dos Linfócitos Th1 como inibidores da multiplicação intracelular do protozoário *T. gondii* [18]. Portanto, essa imunossupressão pode levar a reativação da infecção nas fêmeas prenhes e permitir que o *T. gondii* seja reativado e transmitido da mãe para o feto. Esse fenômeno imunológico também é descrito para a infecção por *N. caninum* em vacas prenhes [17,19].

A imunoglobulina G (IgG) é sintetizada e secretada por plasmócitos (derivados de linfócitos B) no baço, linfonodos e na medula óssea. Na vida embrionária do cordeiro, os linfonodos e os linfócitos B são detectados por volta do 48º e 50º dias após a concepção. Na polpa branca do baço, órgão linfoide secundário rico em linfócitos, é onde ocorre resposta imune adquirida e produção de anticorpos, antes mesmo da formação das Placas de Peyer jejunais (75- 80 dias) e as ileais (110-115 dias), sendo esta última considerada a fonte mais importante de linfócitos B em cordeiros [8]. Sendo assim, os ovinos conseguem montar uma resposta imune desde o segundo mês de gestação, enquanto que a aquisição de anticorpos maternos só é possível através da ingestão do colostro, devido a conformação da placenta nesta espécie. Portanto, os animais que já nasceram com anticorpos circulantes sofreram infecção intrauterina.

Neste trabalho, os cordeiros congenitamente infectados nasceram clinicamente saudáveis, corroborando com um trabalho realizado na Escócia, onde foram avaliadas crias de 31 fêmeas ovinas cronicamente infectadas e verificaram-se que os filhotes positivos na coleta pré-colostral também nasceram clinicamente saudáveis, utilizando RIFI e Western Blot como métodos de diagnóstico [20]. Em bovinos, espécie que a transmissão transplacentária endógena por *N. caninum*, coccídeo similar ao *T.gondii*, é muito comum e bastante estudada, verifica-se que a recrudescência da infecção durante a prenhez não causa danos a gestação e os bezerros nascem clinicamente saudáveis, porém infectados congenitamente [21, 22].

Observou-se que 48 horas após o nascimento, a titulação de anticorpos aumentou nos filhotes positivos na coleta pré-colostral, superando os títulos das mães, provavelmente porque os anticorpos produzidos por eles somaram-se aos recebidos através do colostro. Porém, na maioria dos animais que não foram positivos na coleta pré-colostral, o título de anticorpos declinou em relação às mães e ainda foram diminuindo a cada semana (Gráfico III). Em um estudo sobre toxoplasmose congênita em cordeiros, relataram que títulos constantes ou ascendentes de IgG indicam infecção, porém quando os títulos decrescem ou até mesmo desaparecem em poucos meses, indicam apenas transmissão passiva de anticorpos pelo colostro [23].

Os animais com infecção endógena nasceram clinicamente saudáveis. Em pesquisa sugerem que o equilíbrio entre a resposta imune dos hospedeiros e a virulência do parasita são fatores determinantes para o que o agente cause aborto ou uma infecção persistente no feto [24]. No Brasil, vários estudos demonstram a presença de cepas virulentas de *T. gondii* em diversas espécies de animais. Em um destes trabalhos, realizado no estado de São Paulo, Brasil, verificaram que seis de 16 isolados foram capazes de provocar a morte de todos os camundongos infectados, indicando ainda que

ovinos assintomáticos podem albergar cepas virulentas de *T. gondii* [25]. No semiárido do Brasil, já foram realizadas pesquisas para avaliação da virulência das cepas encontradas em suínos onde obtiveram 13 isolados e destes oito foram letais para pelo menos um camundongo até 30 dias pós-inoculação [26] e outro estudo realizado em galinhas criadas em sistema extensivo, encontraram 33 isolados, e destes 48,5% foram letais para todos os camundongos até 30 dias pós-inoculação [27].

Apesar de não ter sido observada correlações significativas na análise estatística entre os níveis de anticorpos de matrizes e cordeiros, deve-se atentar ao fato de que na maioria dos casos (24/41) em que os cordeiros foram positivos, as mães também eram com títulos de anticorpos iguais ou superiores (Gráfico II). Vale salientar que em três dos quatro casos em que ocorreu infecção transplacentária houve um aumento nos títulos de anticorpos dos filhotes (Gráfico I). Até o presente momento não há trabalhos descrevendo a evolução da infecção em animais persistentemente infectados, no entanto a ocorrência de problemas reprodutivos além da presença de animais carreadores do *T. gondii* dentro do rebanho são alguns dos resultados da infecção transplacentária.

Foi possível observar que 11 matrizes positivas geraram 17 neonatos negativos nas amostras pós colostrais, esta interface materno-fetal encontrada, pode estar associada a variações imunológicas individuais em relação ao desenlace da gestação [28]. Outro fator capaz de justificar esta ocorrência está relacionado a falha na transmissão de anticorpos através do colostro, em que os neonatos se situam em uma condição imune denominada de Falha de Transferência de Imunidade Passiva (FTIP). Nesta circunstância os neonatos são incapazes de absorver quantidades suficientes de anticorpos. Esta falha pode ser explicada quando relacionada ao nível de agressividade do agente e a quantidade de imunoglobulinas circulantes no sangue materno, que pode mudar de acordo com a fase da infecção [29]. Há relatos que se a infecção acontecer em

gestação precedente ou anterior a cópula, a memória imunológica e a imunidade constituídas irão garantir o parto saudável e nascimento de concepto não infectado [30].

A taxa de transmissão vertical do *T. gondii* observada na presente pesquisa, nos sugere a importância desta rota de manutenção e transmissão do agente na espécie ovina, possibilitando problemas reprodutivos e também a disseminação deste protozoário para os seres humanos e outros animais.

5. Conclusões

As ovelhas cronicamente infectadas podem transmitir por via endógena o *T. gondii* para as suas crias e as crias infectadas congenitamente podem nascer clinicamente saudáveis. Os anticorpos maternos anti *T. gondii* adquiridos através do colostro desaparecem na grande maioria dos animais com dois meses de vida. Destaca-se a importância da transmissão vertical como mantenedora do *T. gondii* nos rebanhos ovinos da região estudada.

Contribuição dos autores

FC, DN, TF, VV e SS projetaram os experimentos. FT, DN, MO, SS, RS e WS realizaram os experimentos. FC, DN, TF e SS analisaram os dados. FC, DN e TF escreveram e editaram o manuscrito.

Declaração de interesse concorrente

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

- [1] M.F. Pereira, R.M. Peixoto, H. Langoni, H. Grega Junior, S.S. Azevedo, W.J.N. Porto, E.S. Medeiros, R.A. Mota, Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco, *Pesq Vet Bras*, 32(2) (2012) 140-146. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200009>
- [2] J.P. Dubey, C.P. Beattie, *Toxoplasmosis of animals and man*, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1988.
- [3] A. Hurtado, G. Aduriz, B. Moreno, J. Barandika, A.L. Garcia-Perez, Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes, *Vet Parasitol*, 102 (2001) 17-27. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00526-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00526-X)
- [4] A. Freyre, J. Bonino, J. Falcón, D. Castells, D. Correa, A. Casaretto, The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay, *Vet Parasitol*, 81 (1999) 85-88. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00069-1)
- [5] É.P.B.X. Moraes, M.M. Costa, A.F.M. Dantas, J.A.R. Silva, R.A. Mota, *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil, *Vet Parasitol*, 183(1-2) (2011) 152–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.06.023>
- [6] M.P. Gabardo, J.S.V. Oliveira, R. Ecco, R.M.C. Guedes, Outbreak of ovine abortion by toxoplasmosis in southeastern Brazil, *Braz J Vet Pathol*, 6(1) (2013) 37-41.

- [7] A.J. Trees, D.J.L. Williams, Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, Trends Parasitol, 21(12) (2005) 558-561. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>
- [8] I. Tizard, Imunologia veterinária: uma introdução, 10 ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2019.
- [9] M.E. Camargo, Introdução às técnicas de imunofluorescência, Vet Bras Patol Clin, 10(1) (1974) 143-169.
- [10] E.L.B. Correia, T.F. Feitosa, F.A. Santos, S.S. Azevedo, H.F.J. Pena, S.M. Gennari, R.A. Mota, C.J. Alves, Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet, 24(3) (2015) 383-386. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015043>
- [11] OIE. Leptospirosis. In OIE Terrestrial Manual 2014. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf, 2014 (accessed 23 November 2019).
- [12] PNCEBT. Instrução normativa SDA No 10, DE 3 DE MARÇO DE 2017. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/1IN102017.pdf>, 2017 (accessed 23 November 2019).

- [13] D.P. Chiebao, H.F. Pena, D. Passarelli, T. Santín, L.H. Pulz, R.F. Strefezzi, A.P. Sevá, C.M. Martins, E.G. Lopes, J.H.H. Grisi Filho, S.M. Gennari, R.M. Soares, Congenital transmission of *Toxoplasma gondii* after experimental reinfection with Brazilian typical strains in chronically infected sheep, *Front Vet Sci*, 6 (2019) 93. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00093>
- [14] L. Mišurová, V. Svobodová, L. Pavlata, R. Dvořák, Titres of Specific Antibodies against *Toxoplasma gondii* in Goats and their Kids, *Acta Vet Brno*, 78 (2009) 259-266. <https://doi.org/10.2754/avb200978020259>
- [15] T.R. dos Santos, G.S.M. Faria, B.M. Guerreiro, N.H.P.S. Dal Pietro, W.D.Z. Lopes, H.M. Silva, J.L. Garcia, M.C.R. Luvizotto, K.D.S. Bresciani, A.J. Costa, Congenital toxoplasmosis in chronically infected and subsequently challenged ewes. *Plos One*, 11(10) (2016) 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165124>
- [16] E. Morley, R. Williams, J. Hughes, D. Thomasson, R. Terry, P. Duncanson, J.E. Smith, G. Hide, Evidence that primary infection of Charollais sheep with *Toxoplasma gondii* may not prevent foetal infection and abortion in subsequent lambing, *Paratitol*, 135(2) (2008) 169-173. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003721>
- [17] E.A. Innes, A.G. Andrianarivo, C. Bjorkman, D.J.L. Williams, P.A. Conrad, Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination, *Trends Parasitol*, 18 (2002) 497-504. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02372-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02372-3)

- [18] E.A. Innes, A.N. Vermeulen, Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitol*, 133 (2006) 145-168. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001855>
- [19] D. Buxton, M.M. McAllister, J.P. Dubey, The comparative pathogenesis of neosporosis, *Trends Parasitol*, 18(12) (2002) 546–552. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02414-5)
- [20] S.M. Rodger, S.W. Maley, S.E. Wright, A. Mackellar, F. Weley, J. Sales, D. Buxton, Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep, *Vet Rec*, 159 (2006) 768-771. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.159.23.768>
- [21] D.J.L. Williams, C.S. Hartley, C. Björkman, A.J. Trees, Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*: How the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease, *Parasitol*, 136 (2009) 1895-1900. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990588>
- [22] D.P. Fioretti, P. Pasqual, M. Diaferia, V. Mangili, L. Rosignoli, *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation, *J Vet Med B*, 50 (2003) 399-404. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00686.x>
- [23] J.P. Dubey, J.P. Emont, G. Desmonts, W.R. Anderson, Serodiagnosis of postnatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep, *Am J Vet Res*, 48 (1987) 1239-1243.

- [24] D. Buxton, S.M. Rodger, S.W. Maley, S.E. Wright, Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission, *Small Ruminant Res*, 62(1-2) (2006) 43-46. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.037>
- [25] A.M. Ragozo, R.L. Yai, L.N. Oliveira, R.A. Dias, J.P. Dubey, S.M. Gennari, Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo state, Brazil. *J Parasitol*, 94(6) (2008) 1259-1263. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1641.1>
- [26] T.F. Feitosa, V.L.R. Vilela, L.R. de Melo, J.L. de Almeida Neto, D.V. Souto, D.F. de Moraes, A.C.R. Athayde, S.S. Azevedo, H.F.J. Pena, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil, *Vet Parasitol*, 202(3-4) (2014) 305-309. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.015>
- [27] T.F. Feitosa, V.L.R. Vilela, J.L. Almeida-Neto, A. Santos, D.F. Moraes, A.C.R. Athayde, S.S. Azevedo, H.F.J. Pena, First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraíba state, Brazil, *Parasitol Res*, 115(10) (2016) 3983- 3990. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5164-5>
- [28] D. Buxton, S.W. Maley, S.E. Wright, S. Rodger, P. Bartley, E.A. Innes, *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story, *Vet Parasitol*, 149(1-2) (2007) 25–28. <http://dx.doi.org/10.1016 / j.vetpar.2007.07.003>

[29] F. L. F. Feitosa, D. G. Camargo, R. Yanaka, L. C. N. Mendes, J. R. Peiró, F. Bovino, J. A. N. Lisboa, S. H. V. Perri, E. R. F. Gasparelli, Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP, *Pesq Vet Bras*, 30(8) (2010) 696-704. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000800015>

[30] C. Mccolgan, D. Buxton, D.A. Blewett, Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy, *Vet Rec*, 123(18) (1988) 467–470. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.123.18.467>

Figura 1. Representação geográfica das propriedades ovinas analisadas para compor a pesquisa, localizadas no semiárido do Brasil.

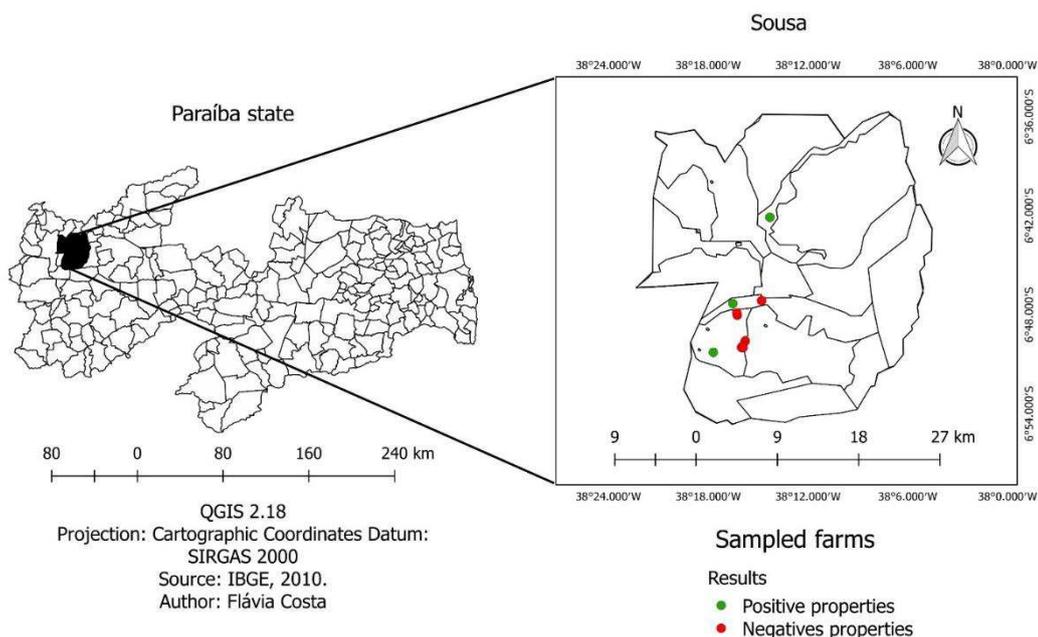


Tabela 1

Distribuição numérica dos títulos de anticorpos das ovelhas que apresentaram IgG contra *Toxoplasma gondii* e a relação com a ocorrência da transmissão vertical.

Titulação	Número de ovelhas positivas (%)	Transmissão vertical (%)
64	6	-
128	9	2 (22.2)
256	6	1(16.6)
512	2	-
1024	3	-
2048	2	-
4096	-	-
8192	2	1 (50%)
Total	30	4 (13.3%)

Tabela 2

Titulação das ovelhas positivas para anticorpos anti. *T. gondii* e acompanhamento sorológico de suas respectivas crias até os 56 dias de vida.

Ovelhas			Cordeiros									
Nº	Titulação	Nº	PC	48h	7d	14d	21d	28d	35d	42d	49d	56d
01	64	01	0	0	NC							
		02	0	0	NC							
02	64	03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
03	64	04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
04	64	05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05	64	07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		08	0	128	0	0	0	0	0	0	0	0
06	64	09	0	0	NC							
07	128	10	64	128	NC							
08	128	11	512	2048	NC							
09	128	12	0	64	64	64	64	64	NC	NC	NC	NC
		13	0	64	0	0	0	0	NC	NC	NC	NC
10	128	14	0	128	128	64	64	128	64	64	0	0
		15	0	128	64	64	64	64	64	64	0	0
11	128	16	0	128	64	64	64	64	128	64	0	0
12	128	17	0	128	128	64	64	64	64	64	64	64
13	128	18	0	128	128	128	64	64	64	64	0	0
14	128	19	0	512	512	128	256	128	128	128	128	0
15	128	20	0	0	NC							
16	256	21	0	0	NC							
		22	0	0	NC							
17	256	23	0	0	NC							
		24	64	128	NC							
18	256	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	256	26	0	64	64	64	64	64	64	64	0	0
20	256	27	0	128	128	128	64	64	64	64	64	64
		28	0	64	NC							
21	256	29	0	0	NC							
		30	0	0	NC							
22	512	31	0	256	128	NC						
23	512	32	0	0	NC							
		33	0	0	NC							
24	1024	34	0	128	NC							
		35	0	2048	NC							
25	1024	36	0	128	NC							
		37	0	128	64	NC						
26	1024	38	0	128	512	NC						
27	2048	39	0	256	128	128	64	64	64	128	64	0
28	2048	40	8192	16384	NC							
29	8192	41	0	64	NC							
30	8192											

PC = pré-colostral

NC = não coletado

Gráfico I. Relação dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos filhotes de ovelhas positivas antes da ingestão do colostro (●) e das ovelhas positivas (▲).

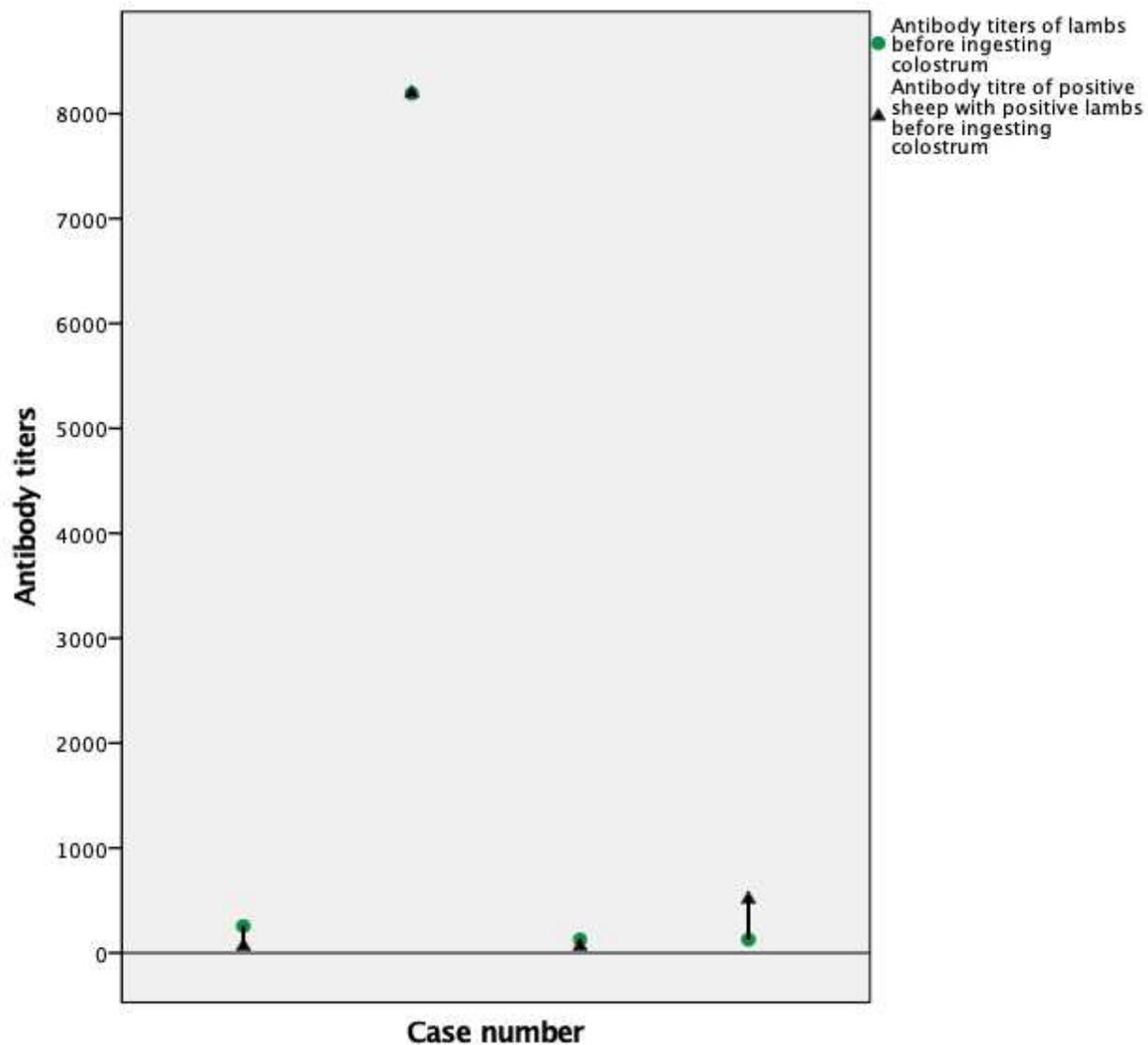


Gráfico II. Relação dos títulos de anticorpos anti-*T.gondii* de ovelhas positivas (●) e dos seus filhotes 48h após a ingestão do colostro (▲).

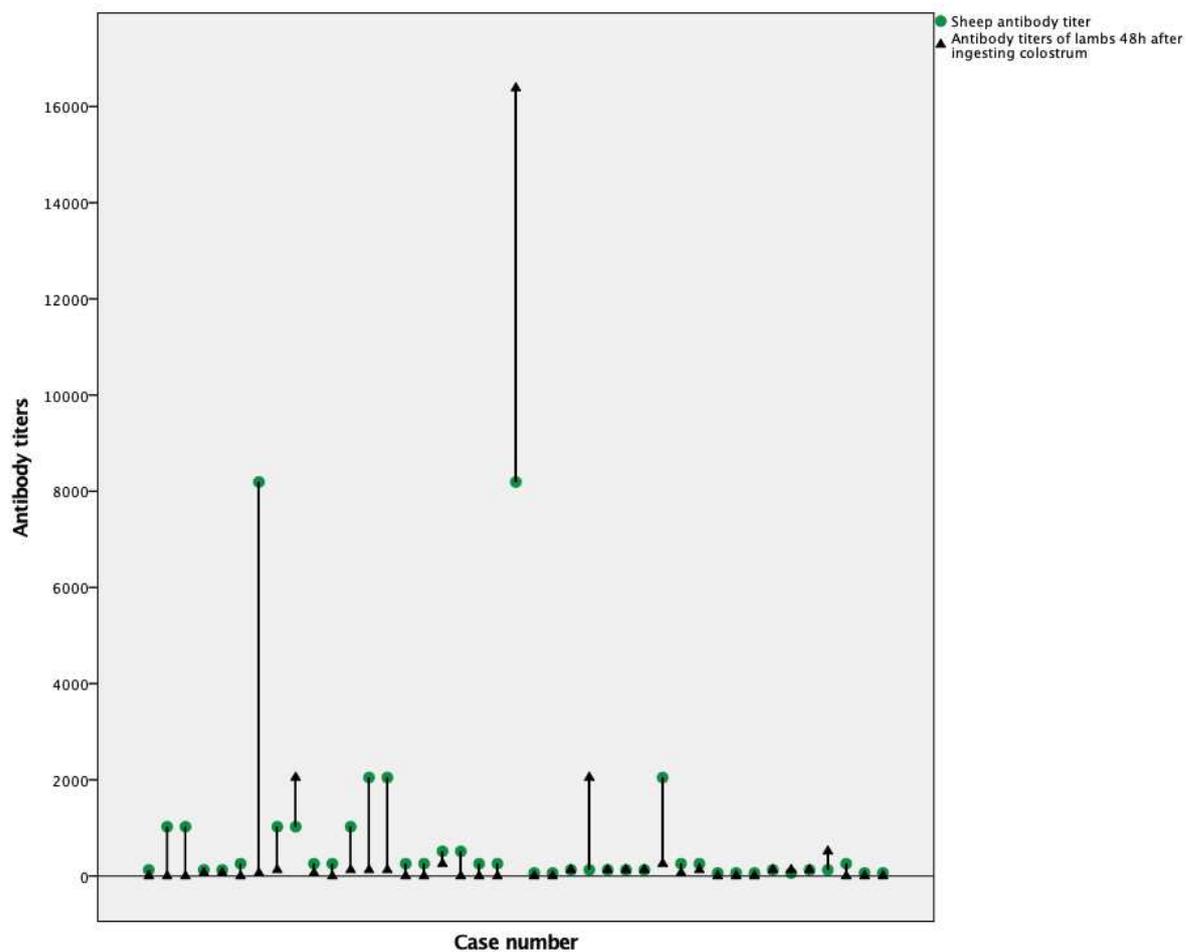
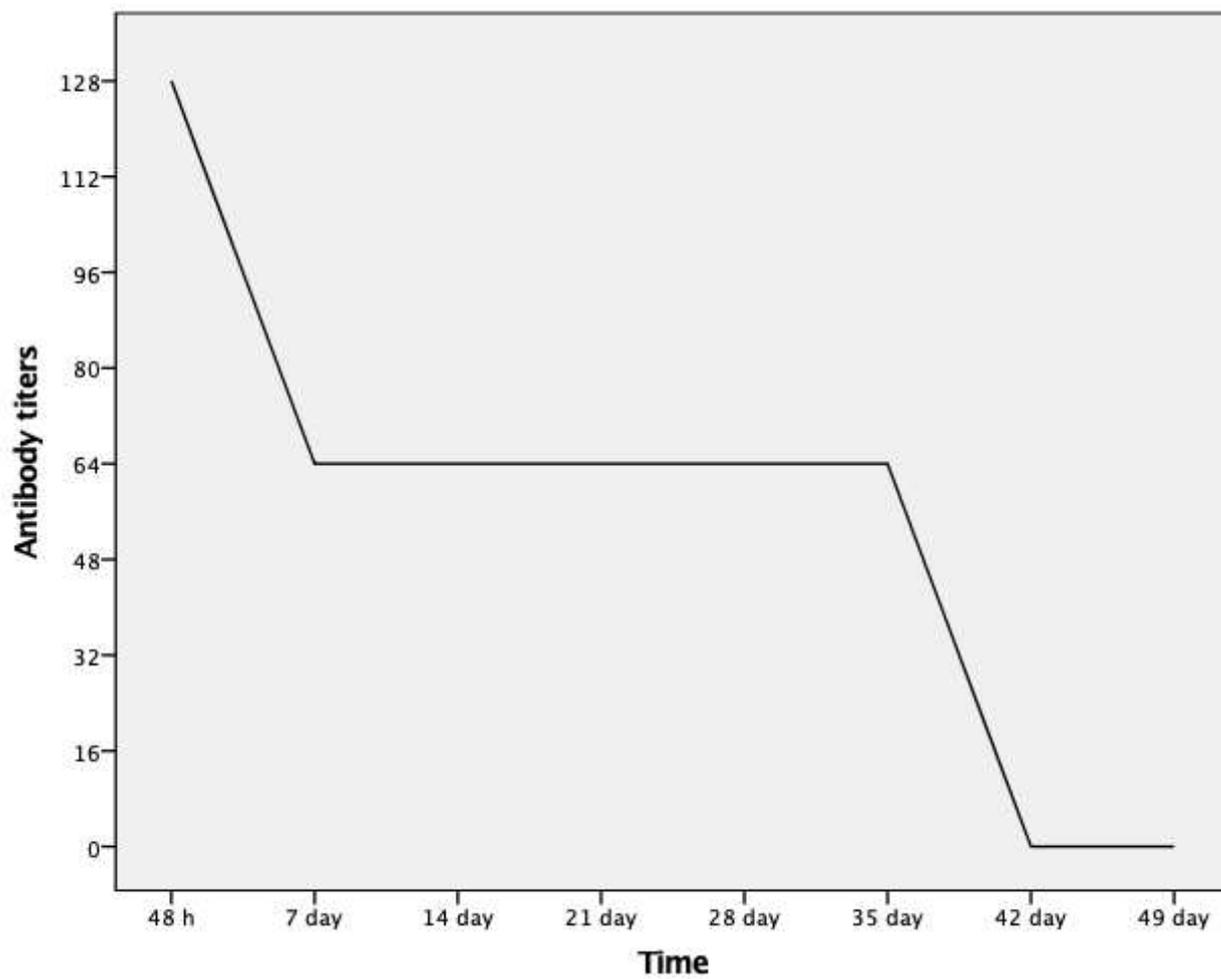


Gráfico III. Relação dos níveis de anticorpos anti-*T.gondii* dos cordeiros positivos após a ingestão do colostro com a progressão da infecção (dias).



CAPÍTULO II:

Revisão sistemática e metanálise da taxa de transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em ovinos

Flávia Teresa Ribeiro da Costa¹; Clécio Henrique Limeira¹; Denise Batista Nogueira¹;
Camila de Sousa Bezerra¹; Brunna Muniz Rodrigues Falcão¹; Gisele Cândida
Ramalho¹; Larissa Claudino Ferreira¹; Sérgio Santos de Azevedo¹; Thais Ferreira
Feitosa²; Vinícius Longo Ribeiro Vilela^{1*}

(Artigo à ser submetido ao periódico: *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* /
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Qualis A2, Fator de impacto 1.013)

**Systematic review and meta-analysis of the rate of vertical transmission of
Toxoplasma gondii in sheep**

**Revisão sistemática e metanálise da taxa de transmissão vertical de *Toxoplasma
gondii* em ovinos**

Flávia Teresa Ribeiro da Costa¹; Clécio Henrique Limeira¹; Denise Batista Nogueira¹; Camila de Sousa Bezerra¹; Brunna Muniz Rodrigues Falcão¹; Gisele Cândida Ramalho¹; Larissa Claudino Ferreira²; Sérgio Santos de Azevedo¹; Thais Ferreira Feitosa²; Vinícius Longo Ribeiro Vilela^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

² Laboratório de Imunologia e Doenças Infectocontagiosas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Sousa, Paraíba, Brasil.

Resumo

O *Toxoplasma gondii* é considerado um dos agentes de maior sucesso biológico entre os parasitas capazes de causar zoonoses, sendo descrito na literatura como responsável por acometer mais de 200 espécies. Na espécie ovina, a toxoplasmose tem sido identificada como uma das maiores causas de aborto e outras desordens reprodutivas em diversos países do mundo. Apesar de muitos aspectos sobre a doença estarem apresentados na literatura, algumas questões como a transmissão vertical ainda necessitam de estudos que esclareçam melhor esta rota de manutenção do agente. Desse modo, o objetivo dessa pesquisa foi realizar uma revisão sistemática com metanálise para avaliar a taxa de transmissão vertical de *T.gondii* em ovinos. Foram identificados 10 trabalhos que envolviam estudos de infecção natural e experimental. Seis dos 10 estudos utilizaram o Teste Indireto de Anticorpo Imunofluorescente (IFAT) para realização do diagnóstico. A maioria utilizou duas ou mais técnicas para obtenção dos resultados. Por meio da metanálise, foi encontrada uma elevada taxa de transmissão vertical de 66%. A significativa heterogeneidade encontrada relaciona-se aos diferentes delineamentos das pesquisas e a falta de padronização dos métodos de diagnóstico,

*Corresponding author: Vinícius Longo Ribeiro Vilela. Rua Pedro Antunes, s/n – São Gonçalo, 58814-000, Sousa - PB, Brasil, telefone: (83) 3556-1029 e-mail: vinicius.vilela@ifpb.edu.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9891-7842>

demonstrando a necessidade de realização de novos trabalhos direcionados a transmissão vertical em ovinos e a padronização diagnóstica.

Palavras-chave: IFAT, infecção intrauterina, pequenos ruminantes, toxoplasmose.

Introdução

A toxoplasmose é uma doença de caráter zoonótico com distribuição mundial, causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário capaz de parasitar seres humanos, animais domésticos e silvestres como hospedeiros intermediários e apenas os membros da família *Felidae*, principalmente os felinos domésticos como hospedeiros definitivos. Os animais podem se infectar pelo *T. gondii* através das consecutivas formas primárias: ingestão de oocistos esporulados ao consumir alimentos e água contaminados, ingestão de tecidos de animais contendo cistos infectantes e por transmissão transplacentária (DUBEY & BEATTIE, 1988; MARTINS & VIANA, 1998).

O agente foi descrito pela primeira vez na França no ano de 1908, por Nicolle e Manceaux que o nomearam no ano seguinte de *T. gondii* que significa a junção dos termos *toxon*, vocábulo grego para referir-se ao formato de arco do parasito e *plasma*, vocábulo que significa forma. O parasito foi encontrado por eles em um *Ctenodactylus gundi* (roedor), que estava sendo utilizado para pesquisas em Leishmania no Instituto Pasteur, localizado na Tunísia. Ainda no ano de 1908, o *T. gondii* foi descoberto no Brasil por Splendore em um coelho (DUBEY, 2008). Posteriormente seu ciclo de vida completo foi descoberto e elucidado por Dubey e Frenkel (1972).

Na espécie ovina os primeiros relatos foram apresentados em 1942 (NICOLLE & MANCEAUX, 1969), e desde essa época muitos autores demonstraram por meio de estudos o impacto econômico da toxoplasmose nos ovinos como causa de abortos e outras desordens reprodutivas.

A doença tem sido identificada como uma das maiores causas de problemas reprodutivos em ovinos na Grã-Bretanha, Noruega, Austrália, Nova Zelândia, nos EUA, no Uruguai e em muitos outros países (BLEWETT & WATSON, 1984; DUBEY & BEATTIE, 1988; SKJERVE et al., 1998; FREYRE et al., 1999; BORDE et al. 2006).

Apesar de muitos aspectos sobre a toxoplasmose encontrarem-se aclarados na literatura, existem pontos vinculados a epidemiologia e o desenvolvimento da patologia que ainda precisam de estudos, entre eles os aspectos relacionados a recrudescência da

infecção durante a gestação, a transmissão vertical e os fatores imunológicos relacionados ao processo.

Neste contexto, este estudo buscou realizar uma síntese quantitativa com metanálise por meio de uma revisão sistemática de literatura, visando elucidar os principais aspectos da transmissão vertical do *T. gondii* em matrizes ovinas e seus conceitos, além da perspectiva de contribuir para posteriores estudos relacionados ao tema.

Material e Métodos

Desenho da pesquisa

O estudo é constituído por uma revisão sistemática de literatura, com análise e descrição sucinta de aspectos relacionados a transmissão vertical de *T. gondii* e metanálise de dados quantitativos disponíveis em artigos de periódicos indexados. Para realização da pesquisa foram observadas as recomendações da metodologia PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (MOHER et al., 2009).

Elegibilidade dos artigos

Compuseram os requisitos de seleção as publicações em periódicos indexados de trabalhos completos de pesquisa envolvendo artigos de transmissão vertical em ovinos, naturalmente e experimentalmente infectados e comunicações curtas que apresentassem as características da transmissão vertical. Buscou-se nestes trabalhos dados que descrevessem a taxa de transmissão vertical, medida através do número de cordeiros positivos nascidos de matrizes positivas e os métodos de diagnóstico utilizados na identificação do *T. gondii*. Houve restrições em relação a capítulos de livro, manuais técnicos, resumos de congresso, relato de caso isolado, revisão bibliográfica, sendo todos esses excluídos durante o processo de eleição. Não ocorreu ressalva quanto ao ano de realização ou de publicação do estudo, ao idioma no qual o artigo foi publicado ou ao país no qual o trabalho foi desempenhado.

Após uma análise detalhada e evidente ausência de comunicações curtas referentes ao tema, os tipos de publicações incluídas foram artigos completos que atendessem como critério a presença de informações sobre a taxa de transmissão vertical.

Assim, estudos sobre soroprevalência, avaliação de vacinas e avaliação de genotipagem foram excluídos da pesquisa. Revisões de literatura, notas de pesquisa, editoriais e outros tipos de publicações não descritas nos critérios de inclusão também foram eliminados.

Fontes de informação e estratégias de busca

Atendendo aos critérios de inclusão pré-estabelecidos, o procedimento de acesso aos artigos ocorreu por pesquisa nos bancos de dados PubMed, ScienceDirect, Scopus e Web of Science, empregando a seguinte associação de termos em inglês: {toxoplasma OR toxoplasmosis} AND {sheep OR ewes} AND {vertical-transmission OR congenital-transmission}. As citações dos estudos encontrados contendo título e resumo foram salvas em formato BibTex, exportado para um gerenciador bibliográfico para realização de subsequente seleção. As buscas foram desenvolvidas entre os dias 21 a 28 de novembro de 2019.

Seleção dos estudos e extração dos dados

Inicialmente foi realizada a exclusão de trabalhos duplicados através de uma ferramenta do gerenciador bibliográfico. Após esta etapa dois autores de maneira individual, realizaram uma análise dos títulos e dos resumos para que os estudos que melhor se encaixassem ao tema proposto fossem eleitos, e em seguida realizou-se a leitura completa dos textos. Ao final dessa avaliação, outras pesquisas foram excluídas por não se enquadrarem nos critérios de elegibilidade. Os textos discordantes entre os pesquisadores foram relidos e decididos em comum acordo.

Após a extração das principais informações, realizada de maneira independente por dois dos autores, os dados foram transferidos para uma planilha eletrônica antecipadamente elaborada. Os dados sintetizados a partir dos artigos eleitos foram: referências (autores e ano de publicação), tipo de infecção, país de realização do estudo, total de cordeiros nascidos ou fetos abortados de matrizes positivas, total de cordeiros e/ou fetos positivos, taxa de transmissão vertical (%) e método de diagnóstico.

Análise dos dados

Para o cálculo da metanálise dos estudos primários, foi considerado como desfecho a taxa de transmissão vertical em ovinos, a qual é obtida pela proporção entre

o número de cordeiros/fetos positivos pelo número total de cordeiros/fetos, todos nascidos de mães positivas para *T. gondii*.

A heterogeneidade entre os estudos primários foi avaliada pelo teste Q de Cochran e quantificada pelo teste I^2 de Higgins e Thompson, sendo a estimativa combinada calculada com base no modelo de efeitos aleatórios pelo inverso da variância utilizando o método DerSimonian-Laird. Também foram utilizadas avaliação visual do gráfico de funil e aplicação do teste de Egger para identificar a presença de vieses. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (versão 3.5.1) sob interface do software RStudio (versão 1.1.463).

Resultados

O esquema de busca primária nos bancos de dados e a metodologia de eleição dos estudos estão delineados na Figura 1. Do total de 912 pesquisas, após todas as etapas de exclusão e seleção baseadas nos critérios estabelecidos para a elegibilidade, restaram 20 artigos relacionados a transmissão vertical em ovinos. Destes trabalhos, não foi possível ter acesso a leitura integral de três e sete foram excluídos da metanálise por não apresentarem dados suficientes para o cálculo da taxa de transmissão vertical. Dessa forma, ao final obteve-se 10 artigos, dos quais todos apresentaram dados satisfatórios para realização da metanálise.

Os trabalhos que compõem esta pesquisa foram realizados em cinco países, Brasil (n=4), Escócia (n=1), Inglaterra (n=2), Irã (n= 2) e Irlanda (n=1). Dos quatro estudos realizados no Brasil, dois relataram infecções naturais e dois infecções experimentais, na Inglaterra uma pesquisa com infecção natural e outra experimental, enquanto na Escócia e Irã as pesquisas descreviam apenas a infecção natural e o único trabalho realizado na Irlanda utilizou metodologia experimental. Totalizando desse modo quatro estudos experimentais (40%) e seis naturais (60%).

Com base na metodologia diagnóstica para avaliação da taxa de transmissão vertical, a maioria dos trabalhos realizaram de forma combinada diferentes técnicas, dentre elas estão incluídos métodos diretos (Bioensaio; PCR - Reação em Cadeia da Polimerase e WB -Western Blotting) e indiretos (ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática; HAI - Hemaglutinação Indireta; HAI/2-ME - Hemaglutinação Indireta 2-Mercaptoetanol; Histopatologia, IFAT - Teste Indireto de Anticorpo Imunofluorescente

e IHQ - Imuno-histoquímica, LAT - Teste de Aglutinação em Látex e MAT - Teste de Aglutinação Modificado), conforme demonstrado na tabela 1.

Através do modelo descrito, a taxa de transmissão vertical combinada dos estudos em ovinos foi de 66% (IC 50-79%) (Figura 2). Ao analisar a combinação das taxas de transmissão vertical, o teste Q de Cochran acusou heterogeneidade entre os estudos primários ($p < 0,05$), quantificada pelo teste de I^2 de Higgins e Thompson em 87%, considerada, portanto, uma alta heterogeneidade.

Após análise visual do gráfico de funil (Figura 3), observou-se uma distribuição assimétrica dos estudos, indicando a presença de viés de publicação, porém o teste de Egger não foi significativo para esta hipótese ($p = 0.329$).

Discussão

A taxa de transmissão vertical combinada entre os estudos foi considerada alta, apresentando percentual de 66%. Esse dado sugere que a transmissão vertical pode ser apontada como uma via importante de manutenção do *T. gondii* nos rebanhos ovinos.

Com o intuito de identificar as causas responsáveis pela alta heterogeneidade, realizou-se uma análise detalhada sobre as metodologias de diagnóstico utilizadas, desse modo constatou-se que os trabalhos divergiam em algumas técnicas, principalmente ao tratar-se do IFAT, em que os estudos não seguiram um padrão único.

Nos artigos em que a metodologia apresentava dois ou mais tipos de diagnóstico foi dada preferência para realização da metanálise ao IFAT, uma vez que em meio as técnicas de diagnóstico existentes, esta é indicada como padrão ouro, podendo ser usual tanto na fase aguda (IgM) quanto na fase crônica (IgG) (CAMARGO, 1974; DUBEY & BEATTIE, 1988; DUBEY, 2010). Dos 10 trabalhos revisados, cinco deles (50%) utilizaram amostras de tecidos fetais e sorologia pré-colostral de cordeiros para diagnóstico do *T. gondii*, enquanto três (30%) testaram apenas soros de cordeiros antes da ingestão do colostro e dois (20%) apenas de fetos provenientes de abortos.

O principal fator considerado diferente no diagnóstico pela IFAT relaciona-se ao ponto de corte. Das seis pesquisas que detectaram anticorpos anti-*T.gondii* por meio dessa técnica, os trabalhos de Klauck et al. (2016) e Chiebao et al. (2019) utilizaram título inicial de 64, enquanto Rodger et al. (2006) valeram-se da diluição inicial a partir de 32 e Silva e La Rue (2006); Rassouli et al. (2011) e Movassaghi et al. (2014)

preconizaram ponto de corte primário de 20 (Tabela 1). Dessa forma, é possível sugerir que por se tratar de um teste sorológico, os trabalhos que utilizaram diluições iniciais menores podem ter influenciado na quantidade de resultados positivos, como observado no estudo de Movassaghi et al. (2014) que apresentou taxa de 97%, por meio do ponto de corte inicial de 20. Este fator demonstra a necessidade de mais estudos de padronização de técnicas para melhor uso e comparação dos resultados apresentados entre as pesquisas.

Além disso, o número amostral foi outro fator considerado, uma vez que apresentou quantidades muito discrepantes entre si, variando de amostragens pequenas (n=6) como visto no estudo de O'Donovan et al. (2012) a quantidades significativas (n=421) como o realizado por Williams et al. (2005). Apesar dos artigos selecionados incluírem os critérios determinados de elegibilidade, não exibiam a mesma característica metodológica e apresentavam diferentes desfechos clínicos (ponto de corte e duração do *follow up*), sendo essa também uma importante razão presumível para a heterogeneidade, podendo ser classificada como uma heterogeneidade clínica (SANTOS & CUNHA, 2013).

Existem diferenças entre os países que se destacam como fatores influentes na ocorrência da doença e que podem estar diretamente associados a heterogeneidade obtida nesta pesquisa, dentre os quais pode-se citar os diferentes sistemas de produção, mudanças climáticas, cultura e a vigilância em saúde, que constituem elementos fundamentais para inquéritos epidemiológicos (ELMORE et al., 2010).

Após análise dos países onde os estudos dessa revisão ocorreram, conclui-se que todos se encaixam em um contexto de endemicidade, entretanto mais pesquisas nessas áreas são necessárias. No Reino Unido, onde quatro trabalhos dessa revisão foram realizados e um deles apresentou uma das maiores taxas de transmissão vertical (O'DONOVAN et al., 2012), Bennet e Ijpelaar (2005) estimaram que a toxoplasmose cause um prejuízo a indústria ovina de cerca de 11 milhões de libras ao ano, evidenciando o impacto negativo da doença no local.

Com relação ao delineamento dos estudos, quatro dos 10 trabalhos ocorreram de forma experimental e diferiram entre si seus métodos. Owen, Clarkson e Trees (1998) fizeram três inoculações de 500 oocistos por via oral em 18 matrizes entre 80 e 90 dias de gestação, totalizando 1500 oocistos inoculados, O'Donovan et al. (2012) inocularam 3000 oocistos da cepa Moredum 4 em nove matrizes aos 90 dias de gestação, enquanto que Santos et al. (2016) e Chiebao et al. (2019) dividiram seu número amostral em

grupos inoculados (4 e 5 grupos, respectivamente) e grupo controle (1 em cada experimento), inoculando 2000 e 2500 oocistos, respectivamente, por via oral e além disso foram realizadas reinfecções em ambos estudos com diferentes cepas. Estudos com dinâmica experimental são importantes por possuírem condições apropriadas de observação e controle com relação aos parâmetros definidos, porém em alguns casos podem não refletir a verdadeira interação do agente com hospedeiro e o ambiente, como ocorrem em infecções naturais.

A visualização do gráfico de funil demonstrou uma distribuição assimétrica dos estudos, no entanto a aplicação do teste de Egger não confirmou a presença de viés de publicação, sugerindo que a assimetria no gráfico seja atribuída a outros fatores, como presença de alta heterogeneidade encontrada na metanálise (STERNE et al., 2011).

Conclusão

A alta taxa de transmissão vertical do *T. gondii* descrita nesta revisão sugere que a via congênita seja uma rota importante de manutenção e perpetuação do parasita. Os estudos demonstram a importância da toxoplasmose na espécie ovina, principalmente relacionados a desordens reprodutivas, representando grandes perdas econômicas para o setor. A heterogeneidade encontrada entre os estudos, principalmente relacionada aos diferentes tipos de delineamento e à ausência de padronização das técnicas de diagnóstico das pesquisas em questão, evidenciam a necessidade de realização de novos trabalhos envolvendo o tema. Por fim, anseia-se que os resultados aqui apresentados possam contribuir positivamente para a condução de novas pesquisas sobre a transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos.

Referências Bibliográficas

Bennet R, Ijpelaar J. Updated estimates of the costs associated with thirty four endemic livestock diseases in Great Britain: a note. *J Agri Econ* 2005; 56:135–144. <https://doi.org/10.1111/j.1477-9552.2005.tb00126.x>

Blewett DA, Watson WA. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. III. Observations on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. *Br Vet J* 1984; 140: 54-63.

Borde G, Lowhar G, Adesiyun A. *Toxoplasma gondii* and *Chlamydophila abortus* in caprine abortions in Tobago: a sero-epidmiological study. *J Vet Med* 2006; 53(4): 188-194.

Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Patol Clín* 1974; 10: 143-171.

Chiebao P, Pena HF, Passarelli D, Santín T, Pulz LH, Strefezzi RF et al. Congenital Transmission of *Toxoplasma gondii* After Experimental Reinfection With Brazilian Typical Strains in Chronically Infected Sheep. *Front Vet Sci* 2019; 6(93): 1-11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00093>

Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1988; p. 220.

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HF, de Oliveira LN, Leifer CA et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 157(3-4): 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.036>

Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. Boca Raton: CRC, Taylor & Francis Group; 2010.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol* 2010; 26(4): 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

Freyre A, Bonino J, Falcon J, Castells D, Correa D, Casaretto A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet Parasitol* 1999; 81: 85-88. [http://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00069-1](http://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00069-1)

Klauck V, Pazinato R, Radavelli WM, Custodio E, Bianchi AE, Camillo G et al. *Toxoplasma gondii* infection in dairy ewes: vertical transmission and influence on milk production and reproductive performance. *Microb Pathog* 2016; 99: 101-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.012>

Martins CS, Viana JA. Toxoplasmose – o que todo profissional de saúde deve saber. *Clín Vet* 1998; 3(15): 7-33.

Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Prisma Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009; 6(7): e1000097. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>

Movassaghi AR, Rassouli M, Fazaeli A, Salimi-Bejestani MR. Outbreak of ovine congenital toxoplasmosis in Iran, confirmed by different diagnostic methods. *J Parasit Dis* 2014; 40(1). <http://doi.org/10.1007/s12639-014-0467-x>

Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Acad Sci* 1969; 148: 369-372.

Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 1908;147: 763-766.

O'Donovan J, Proctor A, Gutierrez J, Worrell S, Nally J, Marques P et al. Distribution of Lesions in Fetal Brains Following Experimental Infection of Pregnant Sheep with

Toxoplasma gondii. *Vet Pathol* 2012; 49(3): 462-469. <http://doi.org/10.1177/0300985811424732>

Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. *Vet Record* 1998; 142(17), 445-448. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.142.17.445>

Rassouli M, Razmi GR, Bassami MR, Movassaghi AR, Azizzadeh M. Study on ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in affected herds of Khorasan Razavi Province, Iran based on PCR detection of fetal brains and maternal serology. *Parasitol* 2011; 138: 691–697. <http://doi.org/10.1017/S0031182011000205>

Rodge SM, Maley SW, Wright SE, Mackellar A, Wesley F, Sales J et al. Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep. *Vet Rec* 2006; 159(23): 768-772. <http://doi.org/10.1136/vr.159.23.768>

Sterne JAC, Sutton AJ, Ioannidis JPA, Terrin N, Jones DR, Lau J et al. Recommendations for Examining and Interpreting Funnel Plot Asymmetry in Meta-Analyses of Randomised Controlled Trials. *BMJ* 2011; 342:1-8. <http://doi.org/10.1136/bmj.d4002>

Santos E, Cunha M. Interpretação Crítica dos Resultados Estatísticos de uma Meta-Análise: Estratégias Metodológicas. *Millenium* 2013; 44: 85-98.

Santos TR, Faria GSM, Guerreiro BM, dal Pietro NHPS, Lopes WDZ, da Silva HM et al. Congenital Toxoplasmosis in Chronically Infected and Subsequently Challenged Ewes. *Plos One* 2016; 27: 1-17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0165124>

Silva KLMV, La Rue ML. Possibilidade da transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil. *Cienc Rural* 2006; 36(3): 892-897. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000300025>

Skjerve E, Waldeland H, Nesbakken T, Kapperund G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev Vet Med* 1998; 35(3): 219-227. [http://doi.org/10.1016/s0167-5877\(98\)00057-9](http://doi.org/10.1016/s0167-5877(98)00057-9)

Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE et al. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitol* 2005; 130(3): 301–307. <http://doi.org/10.1017/S0031182004006614>

Figuras

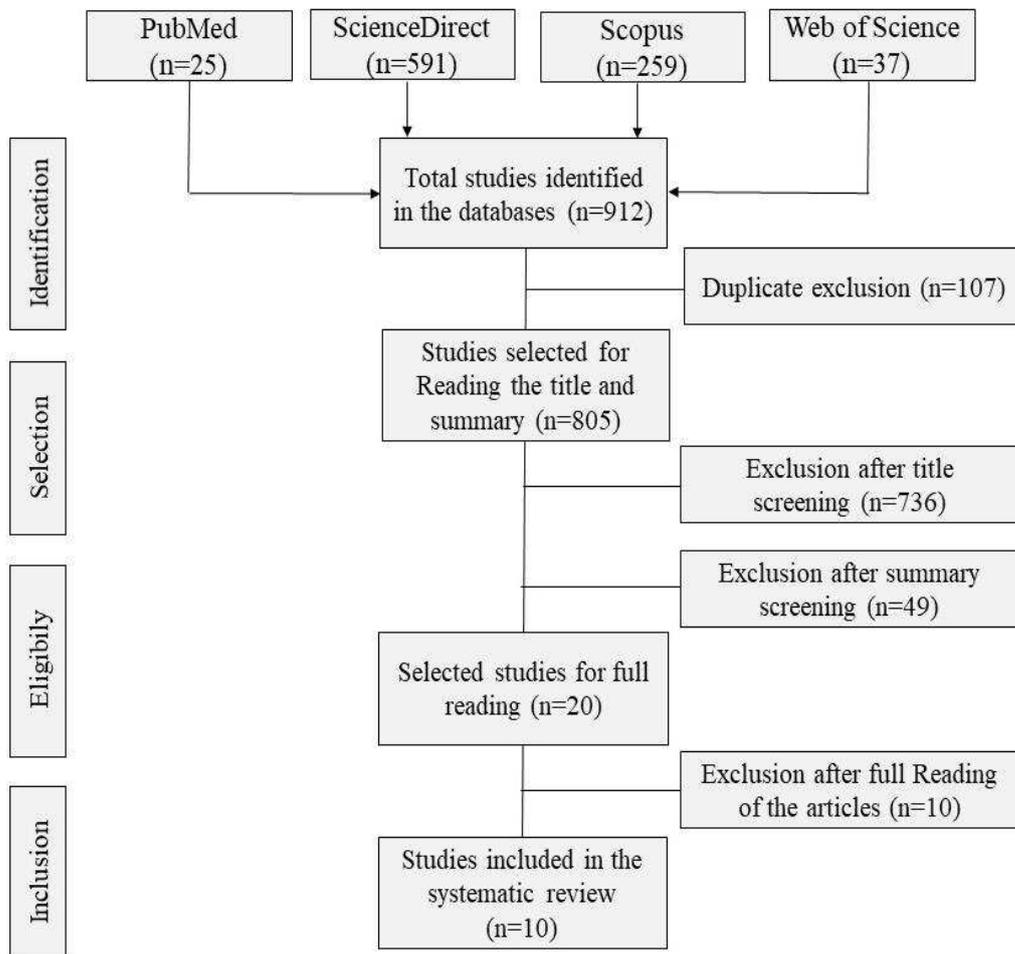


Figura 1. Fluxograma do processo de busca, seleção e inclusão dos estudos na revisão sistemática.

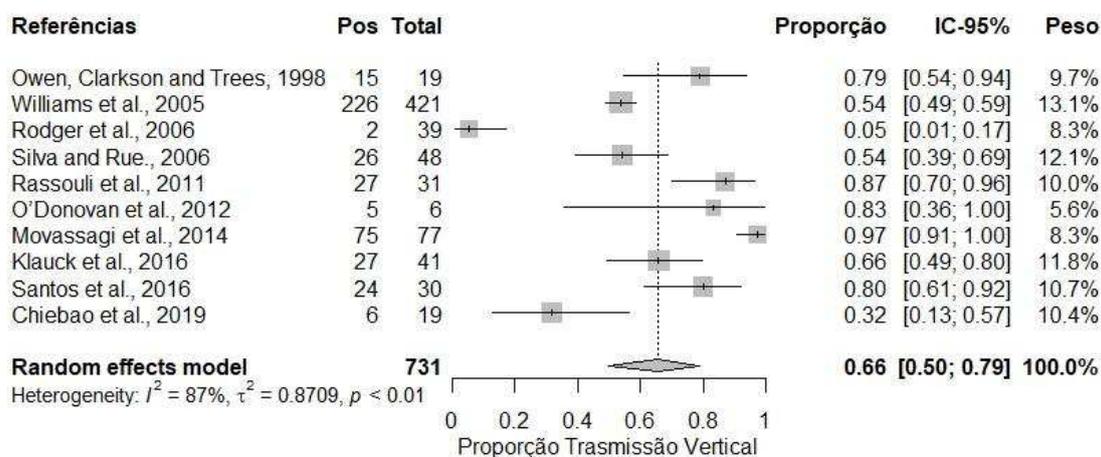


Figura 2. Combinação dos dez estudos de acordo com o resultado da taxa de transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos.

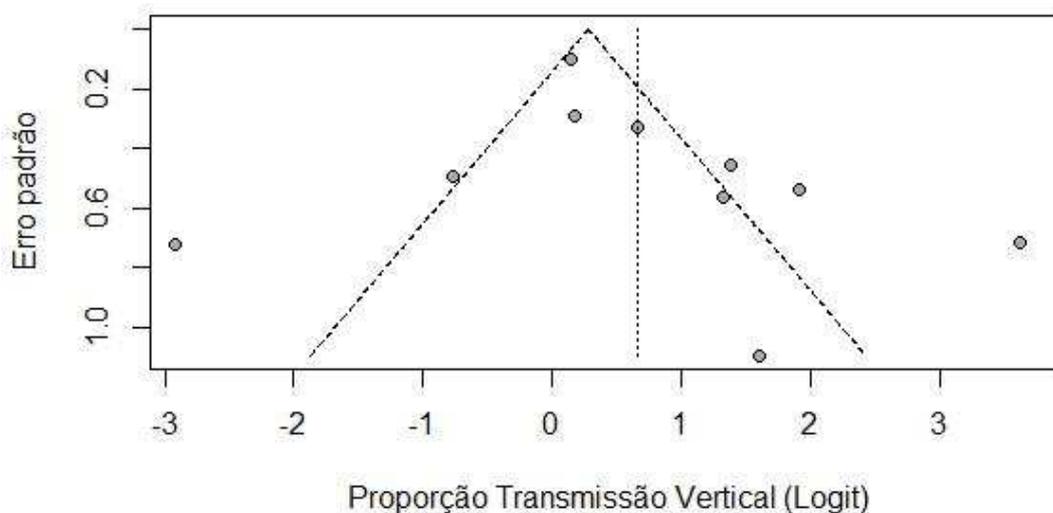


Figura 3. Gráfico de funil apresentando a distribuição assimétrica dos estudos de taxa de transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos.

Tabela 1. Síntese das principais características dos estudos de transmissão vertical em ovinos.

Referências	País	Infecção	Fase do diagnóstico	Número total	Positivos	Taxa de transmissão vertical (%)	Intervalo de confiança (IC*) %	Diagnóstico	Ponto de corte do IFAT
Owen, Clarkson and Trees, 1998	Inglaterra	Experimental	Fetos/cordeiros	19	15	78.95	54 - 94	LAT/MAT	-
Williams et al., 2005	Inglaterra	Natural	Fetos/cordeiros	421	226	53.7	49 - 59	SAG1-PCR	-
Rodger et al., 2006	Escócia	Natural	Fetos/cordeiros	39	2	5.1	01 - 17	ELISA; PCR; WB; Histopatologia; IFAT	32
Silva and La Rue., 2006	Brasil	Natural	Cordeiros	48	26	54.2	39 - 69	IFAT; HAI/2-ME; HAI	20
Rassouli et al., 2011	Irã	Natural	Fetos	31	27	87.1	70 - 96	Nested-PCR; IFAT;	20
O'Donovan et al., 2012	Irlanda	Experimental	Cordeiros	6	5	83.3	36 - 100	ELISA; histopatologia; PCR em tempo real	-
Movassagi et al., 2014	Irã	Natural	Fetos/cordeiros	77	75	97.4	91 - 100	IFAT; histopatologia; bioensaio	20
Klauck et al., 2016	Brasil	Natural	Cordeiros	41	27	65.8	49 - 80	IFAT	64
Santos et al., 2016	Brasil	Experimental	Cordeiros	30	24	80.0	61 - 92	Histopatologia; IHQ; bioensaio; PCR	-
Chiebao et al., 2019	Brasil	Experimental	Cordeiros	19	6	31.6	13 - 59	IFAT; histopatologia; IHQ; bioensaio; PCR-RFLP	64

*IC = 95%

LAT = Teste de Aglutinação em Látex; MAT = Teste de Aglutinação Modificado; SAG1-PCR = Genes Específico de Taquizoíto 1- Reação em Cadeia da Polimerase ; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; PCR = Reação em Cadeia da Polimerase; WB = Western Blotting ; IFAT = Indirect Fluorescent Antibody Test; ; HAI/2-ME = Hemaglutinação Indireta/2- Mercaptoetanol ; HAI = Hemaglutinação Indireta ; IHQ = Imuno-Histoquímica ; PCR-RFLP = Reação em Cadeira da Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação.

CONCLUSÃO GERAL

Devido a criação de ovinos na região Nordeste apresentar-se como uma importante ferramenta do agronegócio associada a subsistência de muitas famílias, principalmente quando inseridas na região rural, estudos relacionados ao aumento da produtividade, sanidade e eficiência reprodutiva são indispensáveis.

A taxa de transmissão vertical do *Toxoplasma gondii* em conceptos descrita nesta dissertação, sugere que a infecção congênita é uma importante rota de transmissão e manutenção de *T. gondii* em rebanhos ovinos no semiárido brasileiro. A ausência de pesquisas com delineamentos mais homogêneos e a falta de padronização das técnicas de diagnóstico observadas na revisão sistemática, evidenciam a necessidade de realização de mais estudos envolvendo esta temática. Por fim, anseia-se que este trabalho possa contribuir positivamente para a condução de novas pesquisas.